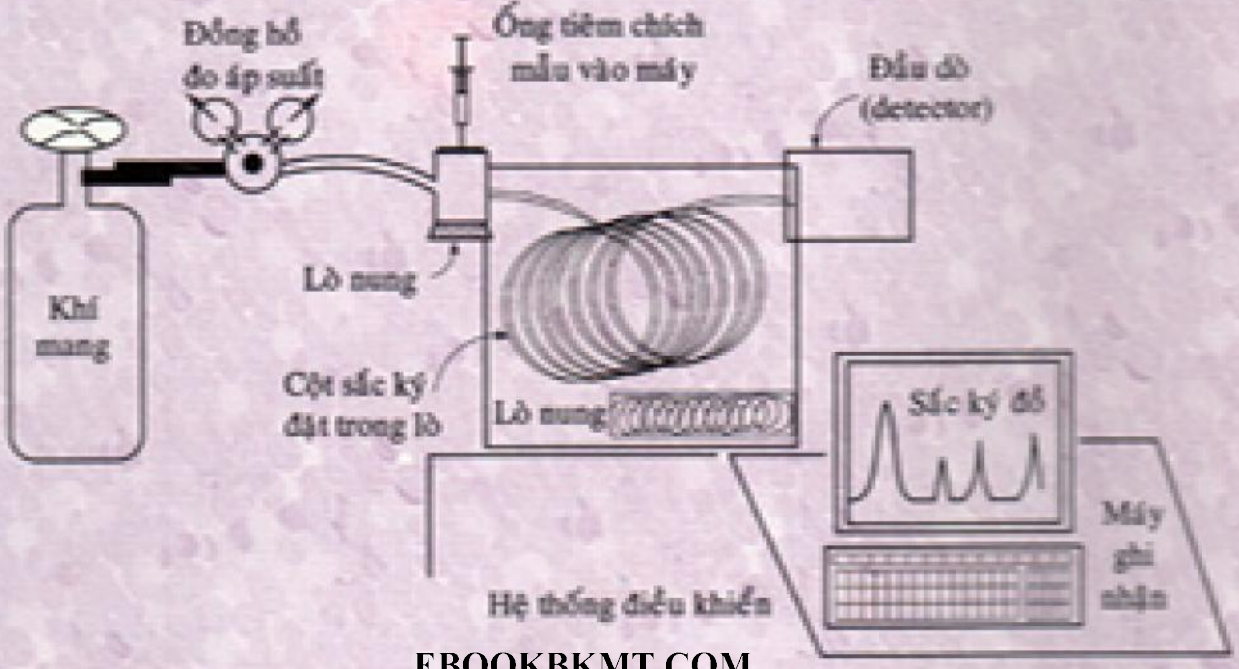
ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP HỒ CHÍ MINH
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

NGUYỄN KIM PHI PHỤNG

PHƯƠNG PHÁP CÔ LẬP HỢP CHẤT HỮU CƠ



EBOOKBKMT.COM

TÀI LIỆU KỸ THUẬT MIỄN PHÍ

NHÀ XUẤT BẢN
ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP HỒ CHÍ MINH

ĐẠI HỌC QUỐC GIA THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

NGUYỄN KIM PHI PHỤNG

PHƯƠNG PHÁP CÔ LẬP HỢP CHẤT HỮU CƠ

EBOOKBKMT.COM

TÀI LIỆU KỸ THUẬT MIỄN PHÍ

NHÀ XUẤT BẢN
ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP HỒ CHÍ MINH – 2007

GT .01. H(V)
ĐHQG.HCM-07 732-2006/47-72/ĐHQGTPHCM H.GT.491-07(T)

Kính tặng

PGS-TS Nguyễn Ngọc Sương

Người cô kính yêu, người đã hướng dẫn tôi đi theo con đường hoá học các hợp chất tự nhiên.

EBOOKBKMT.COM
TÀI LIỆU KỸ THUẬT MIỄN PHÍ

LỜI NÓI ĐẦU

* * *

Sách "*Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*" được biên soạn làm giáo trình cho chương trình cao học của Bộ môn Hoá hữu cơ, Khoa Hoá. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh. Sách cũng hữu ích cho sinh viên các năm cuối bậc đại học, học viên cao học, nghiên cứu sinh chuyên ngành Hoá học và Sinh học, cũng như các nghiên cứu viên ở các Viện Hoá hoặc Sinh Hoá khi cần cô lập một hợp chất hữu cơ từ cây cỏ, từ một phản ứng hóa học hoặc từ các sinh khối.

Việc sử dụng các kỹ thuật sắc ký khác nhau nhằm cô lập hợp chất hữu cơ là một hoạt động mà tất cả những ai làm việc trong các phòng thí nghiệm hoá cũng như sinh đều phải tiến hành thường xuyên, tuy nhiên ở Việt Nam sách trình bày về các loại kiến thức này vẫn còn rất ít. Sách trình bày phần kiến thức cơ bản và cung cấp những kiến thức chuyên sâu về các phương pháp sắc ký, mỗi vấn đề đều có thêm những hình ảnh minh hoạ để người đọc dễ hiểu.

Sách gồm có chín chương và một chương phụ lục:

Chương 1: Kỹ thuật chiết tách hợp chất hữu cơ khỏi cây cỏ

Chương 2: Phương pháp nhận danh các loại hợp chất tự nhiên

Chương 3: Phương pháp sắc ký cột

Chương 4: Phương pháp sắc ký lớp mỏng

Chương 5: Phương pháp sắc ký trao đổi ion

Chương 6: Phương pháp sắc ký gel

Chương 7: Phương pháp sắc ký khí (GC)

Chương 8: Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Chương 9: Điện di

Biên soạn một quyển sách về một lĩnh vực chuyên sâu, hiện đại trong khi ở Việt Nam chưa có nhiều sách về kỹ thuật này nên chúng tôi gặp không ít khó khăn về thuật ngữ. Những thuật ngữ được sử dụng trong sách là theo quyển "Từ điển Kỹ thuật tổng hợp Anh – Việt" của Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 1991. Với phần lớn các thuật ngữ, chúng tôi cố gắng phiên dịch và đều có ghi lại trong ngoặc đơn nguyên mẫu bằng tiếng Anh, còn một số ít thuật ngữ chúng tôi đành để ở nguyên dạng tiếng Anh.

Các hình ảnh trong bài đều là hình ảnh minh họa.

Đây là lần đầu tiên biên soạn quyển sách này nên chúng tôi sẽ khó tránh khỏi những sai sót, rất mong nhận được những ý kiến đóng góp quý báu để chúng tôi có thể hoàn thiện hơn trong những lần tái bản.

Cuối cùng chúng tôi xin chân thành cám ơn PGS-TS Nguyễn Ngọc Sương, người cô kính yêu. Tấm gương lao động khoa học miệt mài của cô là kim chỉ nam để tôi dõi theo mà tiến tới trong khoa học. Cô luôn cho tôi những lời khuyên quý báu trong cuộc sống cũng như trong công tác giảng dạy; cô đã dành thời giờ đáng lẽ để nghỉ ngơi mà đọc giúp bản thảo, giúp tôi kịp thời chỉnh sửa, hoàn tất.

Xin chân thành cảm ơn.

Thành phố Hồ Chí Minh, tháng 05 năm 2007.

TÁC GIẢ

Nguyễn Kim Phi Phụng

CÁC PHƯƠNG PHÁP CÔ LẬP HỢP CHẤT HỮU CƠ

Chương 1

KỸ THUẬT CHIẾT TÁCH HỢP CHẤT TỰ NHIÊN RA KHỎI CÂY CỎ

Hợp chất tự nhiên (natural products), phân tử sinh học tự nhiên (biological molecule), là chất biến dưỡng thứ cấp (secondary metabolite), có trọng lượng phân tử nhỏ ($M \leq 1500$ amu), được tạo ra bởi cơ thể của một sinh vật. Chất biến dưỡng thứ cấp có thể cần thiết hoặc nhiều khi không cần thiết cho sự sống của sinh vật, điều này khác với những hợp chất đại phân tử như protein, acid nucleic, polisacarid là những hợp chất căn bản nhất thiết cần phải có cho sự sống của một sinh vật.

Các chất biến dưỡng thứ cấp bao gồm nhiều loại hợp chất và được sắp xếp thành những nhóm (group) khác nhau. Việc phân loại các hợp chất thành *một nhóm* thường không phải bởi một định nghĩa duy nhất, cũng như ranh giới của một nhóm thường không rõ ràng. Người ta nhận thấy một chất biến dưỡng thứ cấp nào đó thường hay hiện diện trong một loài sinh vật đặc trưng nào đó. Chất biến dưỡng thứ cấp có thể đóng vai trò như một chất gây chán ăn (antifeedants), chất dẫn dụ giới tính (sex attractants), chất kháng sinh (antibiotic agents) để bảo vệ sinh vật đó không bị các loài khác làm hại..., nhưng rất nhiều chất biến dưỡng thứ cấp không có hoạt tính sinh học hoặc có thể có nhưng chưa được biết đến.

Các chất biến dưỡng thứ cấp của thực vật thường thuộc các nhóm sau: alcaloid, quinonoid, steroid, terpenoid (bao gồm tinh dầu là các terpen thấp), iridoid, flavonoid, coumarin, glycosid....

Nếu những hợp chất đại phân tử có trọng lượng phân tử lớn, tính chất hóa học tương đối đồng nhất, người ta có thể đề xuất được một số qui trình

tổng quát để chiết tách cô lập chúng, thì các hợp chất tự nhiên có trọng lượng phân tử nhỏ, tính chất hóa học đa dạng, khác biệt, nên không thể có một qui trình tổng quát nào có thể áp dụng chung cho tất cả các nhóm, mà mỗi loại nhóm phải có một số phương pháp khác nhau, cần phải được khảo sát cụ thể.

Mục đích của việc chiết tách, cô lập hợp chất tự nhiên

Khi một nhà hóa học chọn nghiên cứu trên một loài cây, có thể người ấy muốn hiểu biết một số trong các điều sau.

- Khảo sát thành phần hóa học của một cây mới, trước đó chưa có ai nghiên cứu và xem những chất này có hoạt tính sinh học gì không? Muốn biết được điều này cần phải cô lập hợp chất đạt độ tinh khiết ≥ 95% mới có thể khảo sát cấu trúc hóa học bằng các phương pháp quang phổ hiện đại.

- Cần có thêm lượng mẫu một hợp chất đã biết rõ cấu trúc hóa học, nay muốn khảo sát thêm về hoạt tính sinh học của chất đó. Nếu việc thử nghiệm cho kết quả hấp dẫn thì sẽ xét xem có thể tổng hợp hóa học để có số lượng nhiều.

- Tìm hiểu một hợp chất đã biết và xem chất này được sản sinh ra từ bộ phận nào của sinh vật (sự sinh tổng hợp).

- Tìm hiểu sự khác biệt của những chất biến dưỡng thứ cấp được sản sinh ra từ cùng một nguồn tự nhiên nhưng không cùng điều kiện sinh thái: thí dụ tìm hiểu xem hai thực vật cùng họ (family), cùng chi (genus), cùng loài (species) nhưng mọc ở hai nơi có điều kiện khí hậu, đất đai thổ nhưỡng khác nhau có chứa cùng những hợp chất tự nhiên và những chất này có cùng hàm lượng hay không?

Các nghiên cứu trên cây *Hedyotis corymbosa* L. và cây *Hedyotis diffusa* L. mọc ở Hồng Kông và mọc ở Việt Nam cho biết cả hai loài cây này đều có chứa những hợp chất giống nhau nhưng hàm lượng phần trăm các chất đó trong cây có khác nhau nhiều.

1. QUÁ TRÌNH KHẢO SÁT HÓA – THỰC VẬT CỦA MỘT CÂY

Quá trình khảo sát hoá - thực vật của một loài cây thường theo những giai đoạn như sau

1.1. Lựa chọn nghiên cứu trên một loài cây (của một họ)[1]

Các nhà nghiên cứu quyết định làm việc trên một loài cây của một họ cây nào đó là tuỳ vào mục đích đã lựa chọn trước. Việc lựa chọn này tuỳ thuộc rất nhiều vào tài liệu tham khảo và các phương tiện sẵn có hoặc liên kết được của phòng thí nghiệm đó. Các tài liệu tham khảo có thể là dữ liệu tin học NAPRALERT (phần mềm phải mua) cho biết các thông tin về hóa-thực vật, đặc điểm thực vật, hoạt tính sinh học của hợp chất cụ thể, hoặc tất cả các thông tin có thể có được của từng vùng địa phương, từng quốc gia.

Luôn luôn cần phải có thông tin từ Chemical Abstracts (Viết tắt là C.A.) vì cho biết tổng quát về các nghiên cứu trên thế giới trên một cây nào đó. Tuy nhiên, thông tin trên CA chỉ cho biết tóm tắt kết quả của bài báo, nếu sau khi đọc, nhận thấy thông tin đó cần thiết thì người đọc cần tìm bài báo gốc để có đầy đủ chi tiết hơn (CA cho biết luôn bài báo gốc đã được đăng ở tạp chí nào).

Thông thường sau khi nghiên cứu trên các tài liệu mà nhận thấy rằng cây được chọn khảo sát chưa có tác giả nào trên thế giới nghiên cứu, nghĩa là hoàn toàn không có thông tin nào về thành phần hóa học của cây thì nên tra khảo thành phần hóa học của các cây khác nhưng *cùng một chi* với cây khảo sát. Các nghiên cứu cho thấy có đặc điểm "Hóa – Thực vật" (Chemotaxonomy) nghĩa là những cây cùng một chi (hoặc cùng họ) có thể chứa những hợp chất giống nhau hoặc hợp chất có cùng loại khung sườn.

Thí dụ chi *Hedyotis*, thuộc họ Cà phê (Rubiaceae) thường chứa hợp chất acid triterpen với khung sườn ursan và oleanan. Các cây thuộc họ Rau răm (Polygonaceae), họ Vang (Caesalpiniaceae), họ Táo (Rhamnaceae), họ Cà phê (Rubiaceae)... thường chứa hợp chất antraquinon và cần biết là các antraquinon có tính thăng hoa. Họ Cúc (Asteraceae) thường chứa hợp chất sesquiterpen lacton....

Sau khi đã chọn làm việc trên một loài cây nào đó, cần phải thu thập mẫu cây.

1.2. Xác định tên khoa học cho cây

Rất nhiều trường hợp chỉ với một loài cây nhưng lại có nhiều tên gọi khác nhau tùy theo địa phương. Một loài cây có thể có nhiều tên địa phương khác nhau nhưng chỉ có một tên khoa học (một số ít cây có hai tên khoa học). Thí dụ cây Cúc chỉ thiên *Elephantopus scaber* L., thuộc họ Cúc (Asteraceae) còn có các tên khác như Cỏ lưỡi mèo, Chân voi nhám; vì thế trước khi thu hái mẫu cây cần phải nhờ nhà thực vật nhiều kinh nghiệm xác định tên khoa học cho cây. Muốn vậy cần phải cung cấp cho nhà thực vật mẫu cây tươi, còn nguyên, với đầy đủ các bộ phận hoa, lá, thân, rễ, vì nhiều khi cần phải khảo sát hết tất cả các bộ phận của cây, nhất là bộ phận hoa, rễ, mới có thể xác định được tên khoa học cho cây.

Các nghiên cứu cho thấy tất cả những sự thay đổi về cao độ của vùng cây mọc, tuổi của cây, khí hậu, thổ nhưỡng đều có ảnh hưởng đến hàm lượng của hợp chất trong cây, trong một vài trường hợp có ảnh hưởng đến loại hợp chất được sinh tổng hợp trong cây. Điều này đã được truyền tụng từ lâu trong dân gian qua câu "Cây cam trồng ở Giang Nam thì ngọt, đem về trồng ở Giang Bắc thì chua".

Mỗi bộ phận của cây có thể chứa những chất biến dưỡng thứ cấp khác nhau, thí dụ các flavonoid thường hiện diện trong lá và nhất là hoa của một số loài cây. Các alcaloid tropan hiện diện trong rễ, các sesquiterpen lacton và tinh dầu thường hiện diện ở hạch tiết của lá, vỏ thân.... (Cho dù giả sử có tài liệu cho biết trước rằng một bộ phận của cây chứa loại hợp chất nào đó thì cũng nên có các khảo sát sơ bộ trên các bộ phận riêng biệt hoa, lá, thân, rễ ... để so sánh định tính / định lượng sự hiện diện của các hợp chất đó để có thể chọn được bộ phận cây phù hợp cho nghiên cứu).

Do những lý do nêu trên, trong bài viết báo cáo cần ghi rõ cây đã được thu hái ở địa phương nào, vùng cây mọc có cao độ bao nhiêu, thời tiết và loại đất nơi cây mọc, thời gian thu hái, độ tuổi của cây. Phải ghi rõ tên nhà thực vật (và cơ quan mà nhà thực vật công tác) đã xác định tên khoa học cho cây; mẫu cây được lưu giữ tại viện bảo tàng thực vật địa phương nào hoặc cơ quan

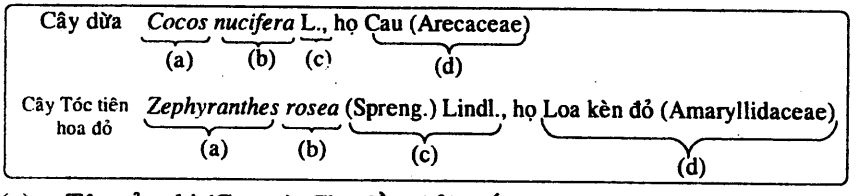
nào. Nếu ở địa phương không có cơ quan này, cần phải bảo quản cây ở dạng khô, đóng thành tập, cất giữ ở nơi khô mát để làm tài liệu so sánh sau này khi cần.

Các nhà thực vật học đã tìm cách đặt cho mỗi loài cây một tên gọi và đã chia Giới thực vật ra thành những bậc phân loại như sau[1]:

Ngành và phân ngành
Lớp và phân lớp
Bộ và phân bộ
Họ và phân họ
Tông và phân tông
Chi và phân chi
Tổ và phân tổ
Loạt và phân loạt
Loài và phân loài
Thứ và phân thứ hay giống trồng
Dạng và phân dạng

Trong các bậc phân loại nói trên, loài (Species) là đơn vị cơ bản. Người ta xếp loài vào chi (Genus), xếp các chi vào họ (Family) tương ứng. Các họ này tuỳ theo hệ thống phân loại của các tác giả mà có sự khác nhau trong tên gọi.

Tên khoa học của một loài cây thường bao gồm bốn phần và cách viết phải theo các qui ước như sau



(a): Tên của chi (Genus): Chữ đầu phải viết hoa, chữ in nghiêng.

(b): Tên của loài (species): Chữ đầu phải viết thường, chữ in nghiêng.

(c): Tên của nhà thực vật lần đầu tiên đã phát hiện cây: Chữ in thẳng. Phải tuân thủ đúng theo tài liệu gốc, thí dụ chữ viết tắt với dấu chấm (L.) hoặc viết trong ngoặc đơn....

(d): Tên của họ (family) gồm hai phần: tên tiếng Việt viết trước và tên tiếng La Tinh được đặt trong ngoặc đơn. Tên tiếng La Tinh của họ cây thường tận cùng bằng chữ "-ceae" vì "-ceae" nghĩa là "họ". Chữ đầu phải viết hoa, chữ in thẳng.

1.3. Xử lý mẫu cây sau khi thu hái

Cần tra khảo tài liệu để biết trước các đặc điểm về thành phần hóa học của cây khảo sát. Tuỳ theo mục đích nghiên cứu, chọn lựa thu hái các bộ phận khác nhau của cây: hoa, lá, vỏ, thân, rễ, củ... tuy nhiên không được thu hái bộ phận cây bị sâu bệnh, nấm mốc, vàng héo, úa dập. Ngoại trừ muốn khảo sát sự hiện diện hoặc hàm lượng của một chất biến dưỡng thứ cấp cụ thể nào đó trong cây thì thu hái cây nhiều lần, mỗi lần có ngày tuổi khác nhau, còn thường lệ nếu muốn tìm hiểu thành phần hóa học của cây cần phải thu hái cây thật già, đã ra hoa, chứa chất có hàm lượng cao để dễ dàng cô lập chất.

Mẫu cây thu hái về được rửa sạch với nước (giống như rửa rau), để ráo, làm khô tự nhiên trong mát có quạt hoặc nơi thoáng gió.

Muốn khảo sát cây khô thì ngay khi cây còn tươi nên sắc nhuyễn, rồi rãi ra phơi khô ở nhiệt độ phòng hoặc sấy trong lò sấy ở 60-80°C. Quá trình này cần tránh không để cây chồng đống dồn nén lên nhau có thể phát sinh nấm mốc, bằng cách thường xuyên đảo trộn cây. Nếu không có lò sấy, có thể phơi khô nhờ ánh nắng, tuy nhiên cần tránh phơi dưới ánh nắng mặt trời gay gắt vì tia tử ngoại (UV) có trong ánh nắng mặt trời có thể kích thích phản ứng hoá học, tạo nên những hợp chất giả tạo (artifact: không phải hợp chất thực sự đã có trong cây). Trong cây thường có những con men (enzym), là những protein không tan trong alcol nhưng tan trong nước, hoạt động ở nhiệt độ 20-45°C và bị tiêu hủy khi nhiệt độ lên 60°C. Khi sấy cây ở 60-80°C các con men đã bị tiêu hủy.

Muốn sấy khô mẫu cây phải tra khảo tài liệu xem cây có chứa những hợp chất tính thăng hoa hay không (thí dụ các hợp chất quinon), vì các hợp chất quinon này có thể thăng hoa trong quá trình sấy mẫu cây khiến cho việc khảo sát thành phần hóa học của cây không chính xác.

Ngoài ra cũng có thể dựa vào tính chất thăng hoa này để loại bỏ antraquinon trong dược liệu vì các antraquinon thường tồn tại trong cây ở dạng oxy hóa hoặc dạng khử (những antraquinon ở liều nhỏ làm tăng nhu động ruột già khiến cho dược liệu chứa nó, thí dụ như lá cây Lô hội *Aloe vera,* có tác dụng nhuận trường, tuy nhiên nếu ở liều cao có tác dụng xổ mạnh, gây đau bụng) nên muốn loại bỏ chúng ra khỏi mẫu cây thì sao hoặc sấy dược liệu ở nhiệt độ thích hợp.

Trường hợp cần khảo sát trên cây tươi: phải nhanh chóng cắt nhuyễn cây và ngâm vào dung môi chiết tách để tránh quá trình lên men hoặc phản ứng hóa học. Đôi khi do sự thay đổi pH, các con men trong cây tươi có thể gây ra sự thủy giải những hợp chất thuộc loại glycosid như iridoid glycosid hoặc flavonoid glycosid. Muốn tránh trường hợp nói trên, có thể diệt những con men có sẵn trong cây bằng cách: (*i*): ngay sau khi thu hái, nhúng mẫu cây vào etanol hoặc metanol rồi để khô tự nhiên ở nơi thoáng mát, (*ii*): sắp xếp mẫu cây trong lò sấy hoặc lò hấp và đặt một becher có chứa *một lượng rất ít* etanol ở ngăn dưới cùng của lò, để hơi etanol đi ngang qua mẫu cây và diệt các con men. Lưu ý cần hết sức cẩn trọng để tránh hỏa hoạn vì hơi etanol ở nhiệt độ nóng có thể phực cháy.

Muốn khảo sát tinh dầu của cây nên tiến hành việc lôi cuốn hơi nước trên mẫu cây tươi để tránh thất thoát tinh dầu vì tinh dầu có tính bay hơi. Các nghiên cứu cho thấy với mỗi loài cây, hàm lượng và thành phần hoá học của tinh dầu sẽ khác nhau tùy theo bộ phận của cây, thổ nhưỡng nơi cây mọc, thời gian để héo cây trước khi thực nghiệm cũng như kỹ thuật sử dụng để lấy tinh dầu ra khỏi cây.

Một số loài cây trong quá trình tồn trữ có mất đi một số cấu phần, thí dụ cây *Antirehа putminosa* mất 50% lượng alcaloid sau hai tháng tồn trữ. Một vài glycosid flavonoid có thể bị thủy giải. Để tránh trường hợp này, lấy một lượng nhỏ mẫu cây tươi, tận chiết với dung môi phù hợp, thu được dung dịch. Dung dịch này được sắc ký lớp mỏng và lưu giữ kết quả để làm tài liệu đối chứng cho những nghiên cứu sau này trên cây hoặc để theo dõi xem có những thay đổi trong quá trình tồn trữ hay không?

Mẫu cây sau khi phơi khô, cần được xay nghiền thành bột. Quá trình nghiền làm phá vỡ màng tế bào thực vật, giúp cho dung môi dễ thấm vào bột cây để chiết tách hết các hợp chất ra khỏi cây. Có nhiều thiết bị chuyên dùng để xay nghiền, từ loại đơn giản đến phức tạp. Máy nghiền có các rây với kích cỡ lỗ khác nhau. Chọn rây có cỡ lỗ nhỏ vừa phải, rây quá mịn sẽ gây khó khăn trong quá trình xay nhuyễn cũng như việc lọc dung môi chiết tách sau này.

Nếu phòng thí nghiệm có sẵn máy xay, trước khi xay cần phải vệ sinh máy nhất là ở bộ phận tán nghiền. Tránh nhờ gia công bên ngoài cơ quan vì các máy xay này ít được vệ sinh bên phần trong của máy trước khi xay. Bộ phận nghiền của máy còn dính bám phần bột cây của quá trình xay trước đó (cây khác), nay trong quá trình xay nghiền, máy bị rung làm các chất bột này rơi chung vào túi chứa mẫu cây của mình, làm sai lạc kết quả. Nếu các chất biến dưỡng thứ cấp kém bền nhiệt, có thể bỏ qua giai đoạn xay nghiền vì quá trình xay nghiền sẽ phát sinh ra nhiệt, làm hư hại chất.

Đôi khi người ta sử dụng kỹ thuật ngâm đông lạnh mẫu cây (mẫu khô hoặc mẫu tươi) trong nitơ lỏng, rồi nghiền giã cây trong một cái cối hoặc trong một cái bao bằng polyetylen dầy. Trong quá trình này, có thể thêm cát tinh chế vào cối để giúp nghiền cho dễ.

1.4. Dung môi để chiết tách hợp chất ra khỏi mẫu cây

Do cấu tạo hóa học của cây cỏ hoặc sinh khối (biomass) thường là những chất liệu đại phân tử (polymer, thí dụ như cellulose có trong cây cỏ, nấm mốc, thành tế bào vi sinh vật) tương đối trơ, không hòa tan trong dung môi hữu cơ, vì thế việc khảo sát hợp chất tự nhiên nghĩa là chiết lấy và khảo sát các chất biến dưỡng thứ cấp có trọng lượng phân tử nhỏ.

Thông thường người ta muốn nghiên cứu các hợp chất tự nhiên có tính ái dầu (lyophilic) có mức độ phân cực khác nhau, tuy nhiên, đôi khi cũng nghiên cứu các hợp chất tự nhiên có tính ái nước (hydrophilic). Điều này được thực hiện bằng cách chiết những hợp chất có trong cây lần lượt bằng các dung môi có tính phân cực tăng dần hoặc chiết một lần lấy tất cả các loại hợp chất bằng cách sử dụng dung môi vạn năng metanol (có thể chiết hầu hết các loại hợp chất tự nhiên).

Nguyên tắc tổng quát là lựa chọn dung môi và qui trình phù hợp để chiết tách hợp chất ra khỏi mẫu cây, điều này tùy thuộc vào đặc tính của chất biến dưỡng thứ cấp có trong cây mà người khảo sát mong muốn tách cô lập (một vài hợp chất glycosid kém bền với nhiệt độ và nhạy với pH của môi trường...). Như đã trình bày ở trên là những hợp chất tự nhiên có cấu trúc hóa học đa dạng, với tính chất phân cực khác biệt, nên không thể có một qui trình tổng quát nào có thể áp dụng chung cho tất cả các nhóm, mà mỗi loại nhóm phải có một số qui trình chiết tách đặc trưng, vì vậy, trước khi tiến hành thực nghiệm cần phải thu thập đầy đủ các tài liệu tham khảo có liên quan trực tiếp trên cây mới có thể chọn được qui trình phù hợp.

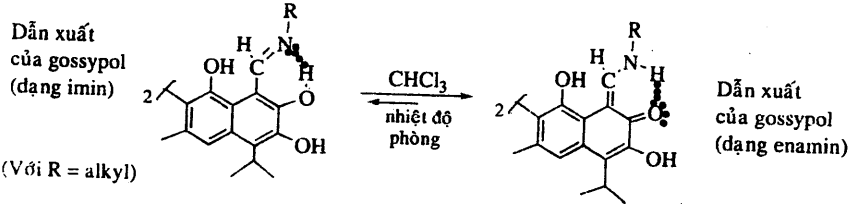
Muốn chiết hợp chất ra khỏi cây cỏ cần chọn dung môi phù hợp, sử dụng kỹ thuật chiết tách phù hợp bằng cách ngâm dầm, bằng máy chiết Soxhlet... (trình bày trong các phần sau). Sau khi chiết, phần bã cây hoặc sinh khối còn lại được lọc bỏ; dung môi qua lọc được thu hồi bằng máy cô quay chân không ở nhiệt độ thấp khoảng 30-40°C vì thực hiện ở nhiệt độ cao có thể làm hư hại một vài hợp chất kém bền nhiệt.

Cần chú ý quan sát quá trình cô quay có thể có tủa, lọc lấy tủa. Nếu tủa này tan trong nước thì đó là muối vô cơ (vì nếu sử dụng etanol để chiết bột cây, etanol hòa tan luôn cả các loại muối vô cơ có trong cây), nếu tủa không tan trong nước nhưng tan trong dung môi hữu cơ thì đó là hợp chất hữu cơ, có thể tinh chế, thu được hợp chất tinh khiết. Đây chỉ là một vài trường hợp đặc biệt khi hợp chất có hàm lượng cao trong cây. Nhắc rằng khi một hợp chất cho kết tủa trong quá trình cô quay dung dịch thì trong dung dịch nước cái vẫn còn chứa rất nhiều hợp chất đó.

Thu hồi dung môi cho cao chiết thô (crude extract), cao này có thể ở dạng khô, dạng dẻo sệt hoặc dạng dầu sệt tùy thuộc vào tính chất của các cấu tử có trong cao. Cao cần loại bỏ hết dung môi còn sót lại để tránh các phản ứng phụ có thể có. Thực hành bằng cách cân lọ chứa cao, lọ được đun cách thủy một khoảng thời gian, sau đó cân lại, nếu hai lần cân đều thấy lọ có trọng lượng suýt soát nhau là dung môi đã được đuổi hết ra khỏi cao.

Không nên tồn trữ hợp chất trong dung môi hữu cơ vì một vài loại hợp chất có thể có sự thay đổi không mong muốn trong cấu trúc hóa học. Thí dụ

dẫn xuất imin của gossypol nếu được bảo quản ở dạng bột khô sẽ luôn hiện diện ở dạng imin, nhưng nếu được để trong dung môi, ở nhiệt độ phòng, sau một vài giờ (hoặc một vài ngày tùy theo từng dẫn xuất) sẽ có xảy ra sự hỗ biến imin - enamin như trình bày trong hình 1.



Hình 1: Dẫn xuất imin của gossypol nếu được ngâm trong dung môi, ở nhiệt độ phòng, sau một thời gian sẽ có xảy ra sự hỗ biến imin -enamin

1.4.1. Lựa chọn dung môi để chiết tách

Chọn dung môi phải có tính trung tính, không độc, không quá dễ cháy, hòa tan được hợp chất cần khảo sát; sau khi chiết tách xong, dung môi đó có thể được loại bỏ dễ dàng. Cần tránh các dung môi độc như benzen hoặc dễ cháy do có nhiệt độ sôi thấp như dietyl eter, carbon tetraclorur...

Bảng 1: Các dung môi có độ phân cực tăng dần theo tham số Snyder lực của dung môi[2].

Tên dung môi	Eo (Al_2O_3)	Nhiệt độ sôi (°C)	Độ nhớt ($mN.S.m^{-2}$)	Bước sóng hấp thu UV (nm)
Pentan	0	36	0,24	210
Cyclohexan	0,04	69	0,98	210
Carbon tetraclorur	0,18	77	0,97	265
Toluen	0,29	111	0,59	286
Dietyl eter	0,38	35	0,25	218
Cloroform	0,40	62	0,57	245
Diclorometan	0,42	40	0,44	235
Tetrahydrofuran	0,45	66	0,55	220
2-Butanon	0,51	80	0,32	330
Aceton	0,56	56	0,32	330

1,4-Dioxan	0,56	107	1,44	215
Etyl acetat	0,58	77	0,45	255
Dietylamin	0,63	115	0,33	275
Acetonitril	0,65	82	0,37	190
2-Propanol	0,82	82	2,50	210
Etanol	0,88	78	1,20	210
Metanol	0,95	64	0,59	210
Nước	1,00	100	1,0	-

Bảng 2: Các dung môi có độ phân cực tăng dần tùy theo hằng số điện môi và độ nhớt[2].

Tên dung môi	Chỉ số phân cực	Chỉ số chiết xuất (20°C)	Nhiệt độ sôi (°C)	Hằng số điện môi ε (ở 25°C)	Độ nhớt ($mN.S.m^{-2}$)	Bước sóng hấp thu UV	Độ tan trong nước (% w/w)
Pentan	0,0	1,358	36	–	0,23	200	0,004
Hexan	0,0	1,375	69	1,90	0,33	200	0,001
Heptan	0,0	1,387	98	–	0,39	200	0,0003
Cyclohexan	0,2	1,426	81	2,0	1,00	200	0,01
CCl_4	1,6	1,466	77	2,2	0,97	263	0,08
Toluen	2,4	1,496	111	2,38	0,59	285	0,51
Xylen	2,5	1,500	139	–	0,61	290	0,018
Benzen	2,7	1,501	80	2,3	0,65	280	0,18
Dietyl eter	2,8	1,353	35	4,34	0,32	220	6,89
Diclorometan	3,1	1,424	41	8,9	0,44	235	1,6
Isopropanol	3,9	1,377	82	18,3	2,30	210	100
n-Butanol	3,9	1,399	118	–	2,98	215	7,81
Tetrahydrofuran	4,0	1,407	65	7,58	0,55	215	100
n-Propanol	4,0	1,384	92	20,1	2,27	210	100
Butyl acetat	4,0	1,394	125	–	0,73	254	0,43
Cloroform	4,1	1,446	61	4,87	0,57	245	0,81
Etyl acetat	4,4	1,372	77	6,0	0,45	260	8,7
Metyl etyl ceton	4,7	1,379	80	–	0,45	329	24
Dioxan	4,8	1,422	101	2,2	1,54	215	100
Aceton	5,1	1,359	56	20,7	0,32	330	100
Metanol	5,1	1,329	65	33,6	0,6	205	100
Etanol	5,2	1,360	78	24,3	1,2	210	100

Acetonitril	5,8	1,344	82	37,5	0,37	190	100
Acid acetic	6,2	1,372	118	6,2	1,26	230	100
Dimetylformamid	6,4	1,431	155	–	0,92	368	100
Dimetylsulfoxid	7,2	1,478	189	4,7	2,00	268	100
Nước	9,0	1,333	100	78,5	1,0	200	100

Người ta thường sử dụng các dung môi không hòa tan trong nước như các hydrocarbon (hexan, toluen), alcol (butanol), ceton (metyl etyl ceton), acetat (etyl, butyl), cloroform, clorur metylen. Các loại dung môi này tương đối rẻ tiền, có bán sẵn, độ nhớt thấp, tỉ trọng tương đối khác so với nước.

Có thể sắp xếp độ phân cực của dung môi dựa vào E^o, tham số Snyder lực của dung môi như trình bày trong bảng 1[2]. Tham số này dựa trên năng lượng hấp thu của pha động là dung môi trên pha tĩnh là alumina (năng lượng hấp thu trên alumina được chọn làm tham số chuẩn, các giá trị cũng tương tự cho silica).

Cũng có thể sắp xếp độ phân cực của dung môi theo hằng số điện môi, độ nhớt... trình bày trong bảng 2.

Các số liệu trong bảng 1 và 2 cho thấy có sự chênh lệch trong thứ tự sắp xếp độ phân cực của dung môi, đó là do các tác giả đã căn cứ vào các tiêu chuẩn khác nhau của các dung môi.

1.4.2. Một số điều cần biết khi sử dụng dung môi để chiết tách hợp chất

✱ Các dung môi cần được chưng cất lại và tồn trữ trong những chai lọ bằng thủy tinh, do trong dung môi thường hay chứa một số tạp bẩn mà thường gặp nhất là chất làm dẻo hóa (plasticizer). Các chất làm dẻo thường gặp là dialkyl ptalat, tri-*n*-butyl acetyl citrat, tri-*n*-butyl phosphat... chúng lẫn vào dung môi do dung môi thường được chứa trong các thùng làm bằng nhựa dẻo.

✱ Metanol và cloroform thường chứa tạp chất là di(2-etylhexyl) ptalat và chất này thường bị nhiều tác giả nhầm lẫn rằng là hợp chất tự nhiên có chứa trong cây cỏ đang khảo sát, dù rằng hợp chất này có một số hoạt tính sinh học.

Sở dĩ cô lập được di(2-etylhexyl) ptalat là do trước đó đã sử dụng một lượng lớn dung môi metanol, cloroform trong quá trình ngâm chiết cây cỏ ban đầu, sau đó, dung dịch chiết này được đuổi dung môi khiến cho số lượng chất làm dẻo hiện diện một cách đáng kể trong cao chiết. Muốn loại bỏ diisooctyl phtalat xin xem mục "loại bỏ một số tạp chất gây cản trở".

* Cloroform ($CHCl_3$), diclorometan (CH_2Cl_2) có thể tạo phản ứng với vài loại alcaloid như brucin, strychnin, ephedrin... để tạo thành alcaloid dạng muối tứ cấp và một vài hợp chất giả tạo khác. Tương tự, các vết HCl có thể gây ra sự phân hủy, sự khử nước, sự đồng phân hóa cho vài hợp chất hữu cơ.

* Sử dụng metanol để chiết có thể cô lập được một số hợp chất giả tạo. Khi chiết nóng cây *Trechonaetes laciniata* với dung môi metanol thay vì cô lập được hợp chất trechonolid A thì tác giả đã cô lập được trechonolid B (do trechonolid A được metyl hóa khi được đun nóng trong metanol với sự hiện diện của vết acid). Tương tự khi chiết nóng cây *Euchresta japonica* với dung môi metanol tác giả đã cô lập được sản phẩm ester metyl của acid 12-cystisineacetic, hợp chất này được cho rằng là sản phẩm ester hóa của hợp chất acid 12-cystisineacetic.

* Dietyl eter (C_2H_5–O–C_2H_5) ít được sử dụng để chiết vì có nhiệt độ sôi thấp dễ cháy, độc, có thể gây mê cho người sử dụng và có khuynh hướng tạo thành peroxid (R-O-O-R) dễ gây nổ. Peroxid này rất hoạt tính, có thể oxid hóa các hợp chất có mang nhiều nối đôi C=C liên hợp như carotenoid. Loại bỏ peroxid ra khỏi dietyl eter bằng cách lắc với $FeSO_4$ rồi chưng cất lại.

* Aceton có thể tạo ra dẫn xuất acetonid nếu hợp chất chiết có chứa nhóm *cis*-1,2-diol hiện diện trong môi trường acid.

* Chiết bằng dung môi được điều chỉnh thành môi trường acid hoặc môi trường kiềm có thể chiết được hợp chất đặc trưng (trước đó phải nghiên cứu kỹ): các antocyanin được chiết ra khỏi nguyên liệu cây tươi ban đầu bằng dung dịch metanol có chứa 1% (w/v) acid clohidric. Các alcaloid có thể được chiết bởi dung dịch acid hoặc kiềm.

Chiết bằng môi trường acid hoặc kiềm có thể thuỷ giải các hợp chất glycosid (môi trường acid sẽ cắt đứt glycosid tại nối acetal làm mất đi phần

đường) hoặc cắt đứt nối ester (môi trường kiềm) hoặc tạo ra sự chuyển vị, thí dụ hợp chất scopine trong cây *Hyoscyamus albus* biến thành hợp chất oscine do sự chuyển vị epoxid.

* Sau khi chiết, dung môi được thu hồi bằng máy cô chân không (evaporator) ở nhiệt độ 30-40°C, chưng cất ở nhiệt độ cao hơn có thể làm hư hại một số hợp chất kém bền nhiệt.

1.5. Lựa chọn qui trình để chiết tách hợp chất ra khỏi mẫu cây

1.5.1. Chiết hợp chất hữu cơ trọng lượng phân tử nhỏ, có tính thân dầu (lyophilic)

Trong quá trình nghiên cứu trên hướng tổng hợp hoặc hướng hóa học các hợp chất thiên nhiên, các nhà hóa học luôn muốn cô lập một hợp chất tinh chất để xác định cấu trúc hóa học bằng các phương pháp hoá lý.

Trong hướng tổng hợp, sau khi thực hiện phản ứng xong, dù có qua một số bước xử lý, sản phẩm thu được vẫn là hỗn hợp, thường gặp nhất là hỗn hợp có ba hợp chất, vì vậy vẫn cần phải sử dụng các phương pháp sắc ký khác nhau để tách riêng các hợp chất. Quá trình theo dõi các sản phẩm thu được từ việc sắc ký tương đối dễ dàng vì đã dự đoán được cấu trúc hóa học của các hợp chất này.

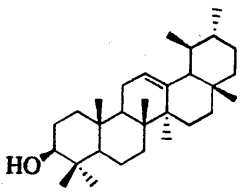
Trong hướng hợp chất thiên nhiên, việc cô lập chất phức tạp hơn vì không biết được cây đang khảo sát có chứa các hợp chất với cấu trúc hóa học ra sao. Biết rằng cây cỏ cần khảo sát hoặc dung dịch lên men vi sinh, đều có chứa nhiều loại hợp chất hữu cơ, từ loại không phân cực đến loại rất phân cực, vì thế nếu muốn cô lập hợp chất mà áp dụng sắc ký cột trực tiếp ngay lên trên cao thô ban đầu sẽ rất khó đạt được kết quả mong muốn. Vì thế người ta thường chuẩn bị một loạt các loại cao chiết có tính phân cực tăng dần, như thế mỗi loại cao chiết chứa tương đối ít hợp chất, giúp cho quá trình cô lập hợp chất tinh chất dễ dàng hơn. Nhìn chung cô lập được một hợp chất tinh chất để xác định cấu trúc hóa học hoặc để thử nghiệm hoạt tính sinh học mất nhiều thời gian hơn.

Muốn có các loại cao có độ phân cực khác nhau, sử dụng các dung môi chiết có độ phân cực khác nhau, dựa trên nguyên tắc chung là "*các chất*

giống nhau sẽ hòa tan nhau": dung môi không phân cực hòa tan tốt các hợp chất không phân cực, dung môi có tính phân cực trung bình sẽ hòa tan tốt các hợp chất có tính phân cực trung bình và dung môi phân cực mạnh sẽ hòa tan tốt các hợp chất phân cực.

Trong hình 2, dung môi và các nhóm chức hóa học được sắp xếp từ trên xuống dưới theo độ phân cực tăng dần. Có một số nhận xét như sau.

- Hình 2 minh họa khái quát sự hoà tan của dung môi ở nhiệt độ phòng. Nếu dung môi được gia nhiệt, khả năng hòa tan của nó sẽ tăng thêm và hoà tan được cả những hợp chất có độ phân cực mạnh hơn nó.
- Hình 2 minh họa khả năng hòa tan của dung môi đối với *một* nhóm chức hóa học. Trong khi đó, một hợp chất thiên nhiên thường có hai hay nhiều nhóm chức hóa học có tính phân cực khá khác biệt nhau, gây khó khăn trong việc lựa chọn dung môi phù hợp để hòa tan chất cần khảo sát, thí dụ như hợp chất α-amyrin như hình sau.

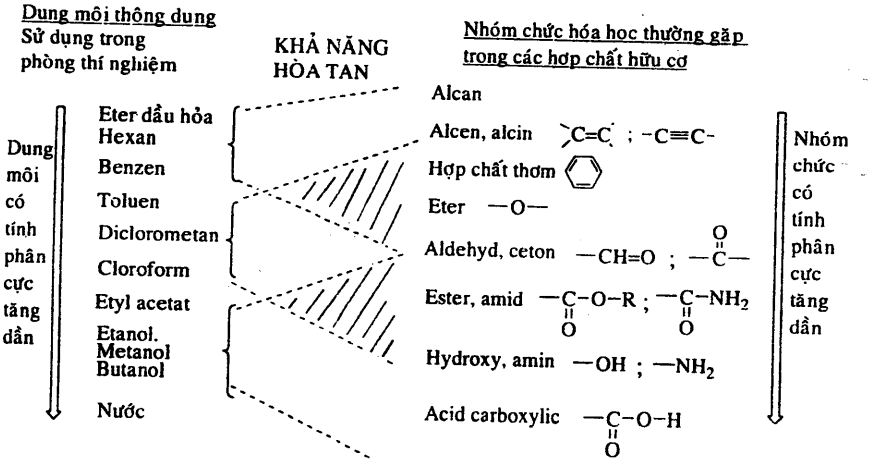


α -Amyrin
Phân tử có 30 carbon với khung sườn có mang một nối đôi
- Vậy đây là loại alcan, alcen: nhóm chức ít phân cực.
- Phân tử cũng mang một nhóm -OH là nhóm có tính phân cực mạnh

- Dung môi không có tính chọn lọc cao. Hình 2 cho thấy các loại dung môi có độ phân cực khác nhau có thể hoà tan các loại hợp chất giống nhau (phần gạch xéo xéo trong hình 2).

Khi cần phải chiết lấy toàn bộ các hợp chất có trong bột cây, các nhà hóa học các hợp chất thiên nhiên thường hay sử dụng dung môi là alcol 80% (etanol, metanol), vì loại dung môi này có khả năng thấm xuyên qua màng tế bào thực vật, cũng như có thể tạo nối hydrogen liên phân tử với các nhóm phân cực khác, nên được xem là dung môi vạn năng, có thể chiết được cả các hợp chất có độ phân cực mạnh, vừa và yếu.

Tuy nhiên, nếu chủ đích muốn nghiên cứu các chất béo trong cây (các alcan, alcol béo, ester béo...) thì tốt nhất vẫn là sử dụng eter dầu hỏa hoặc hexan.



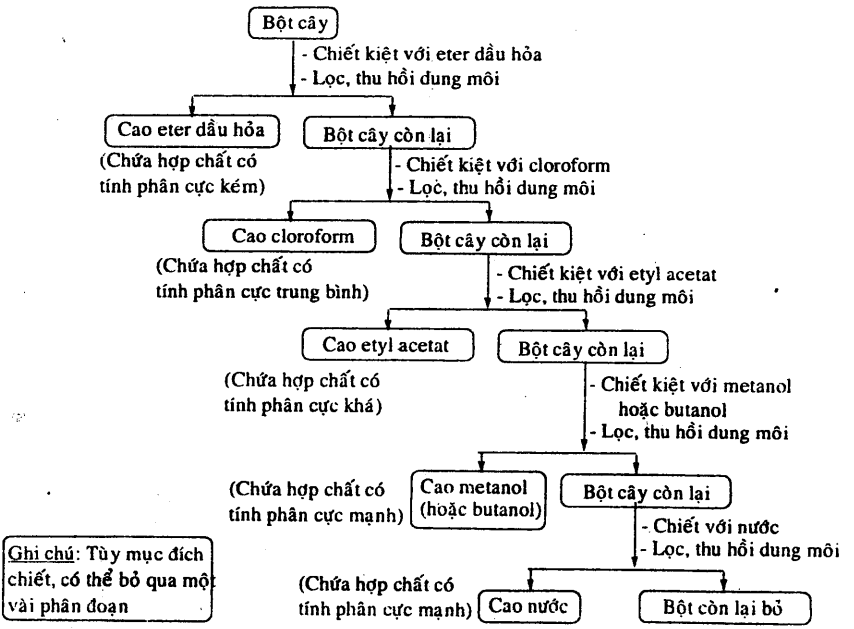
Hình 2: Minh họa khái quát việc dung môi có độ phân cực khác nhau sẽ hoà tan ở nhiệt độ phòng các hợp chất có độ phân cực tương ứng (chỉ phù hợp với hợp chất đơn chức)

- Quá trình sử dụng dung môi để hòa tan hợp chất, chiết lấy chất, là quá trình áp dụng phương pháp chiết rắn - lỏng với nhiều kỹ thuật thực nghiệm khác nhau (trình bày ở phần sau): Từ nguyên liệu đầu tiên là cây cỏ hoặc dung dịch lên men các vi sinh vật, có nhiều kỹ thuật để có được các loại cao chiết khác nhau, như minh họa trong sơ đồ 1.

Đầu tiên bột cây được chiết kiệt với eter dầu hỏa. Dung dịch chiết này được gộp chung lại, thu hồi dung môi sẽ có được cao eter dầu hỏa chứa các loại hợp chất có tính không phân cực. Bột cây còn lại được chiết tiếp với cloroform, thu hồi dung môi, thu được cao cloroform chứa các loại hợp chất có tính phân cực trung bình. Tiếp theo, bột cây được chiết với etyl acetate thu được cao etyl acetat, chứa các loại hợp chất có tính khá phân cực. Cuối cùng bột cây được chiết với metanol hoặc butanol thu cao metanol (hoặc cao butanol) chứa các loại hợp chất có phân cực mạnh.

Căn cứ vào tính phân cực của dung môi và của các hợp chất thiên nhiên, có thể dự đoán sự hiện diện của các loại hợp chất có độ phân cực khác nhau trong các loại cao trong sơ đồ 1.

Sơ đồ 1: Sơ đồ tổng quát điều chế các loại cao có độ phân cực khác nhau từ nguyên liệu cây ban đầu, với mục đích cô lập các hợp chất có tính ái dầu

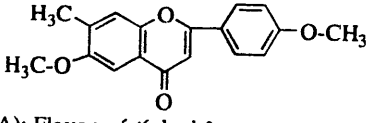


- *Trong cao eter dầu hỏa hoặc cao hexan, cao dietyl eter*: có thể có các hydrocarbon béo và thơm (như triglycerid, alcan mạch carbon dài, alcol béo, ester béo, acid béo...), các thành phần của tinh dầu (monoterpen, sesquiterpen, một vài diterpen bay hơi được), các sterol thực vật (phytosterols), các chất màu thực vật như caroten...
- *Trong cao cloroform hoặc cao etyl acetat*: có thể có các sesquiterpen, diterpen, coumarin, quinon, các aglycon do hợp chất glycosid bị thủy giải, các monoglycosid (chỉ mang một phân tử đường), một số alcaloid loại base yếu.

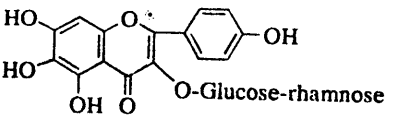
- *Trong cao metanol hoặc cao nước*: có thể có các chất màu thực vật như clorophyl, các glycosid (saponin...), các alcaloid ở dạng muối tứ cấp, kết hợp với các acid hữu cơ, các acid hữu cơ, các muối amin, các tannin, các hydrat carbon có trọng lượng phân tử nhỏ như monosacarid, oligosacarid, một số polysacarid như: pectin, chất nhầy, chất gôm...., các protein thực vật, các muối vô cơ NaCl, KCl, $CaCl_2$ ...

Lưu ý: Trong bất kỳ một loại hợp chất thiên nhiên nào, thí dụ như alcaloid, steroid, flavonoid, iridoid..... cũng có thể có hợp chất có tính phân cực kém và loại hợp chất có tính phân cực mạnh là tuỳ vào việc hợp chất đó có mang nhiều nhóm thế có tính phân cực hoặc không phân cực.

Thí dụ trong minh họa sau: flavon (A) có tính phân cực trung bình vì trong phân tử chứa các nhóm chức có tính phân cực trung bình, như nối đôi C=C, nhóm chức eter –O–, nhóm chức ceton –CO-. Còn flavon (B) có tính phân cực mạnh vì trong phân tử chứa các nhóm chức có tính phân cực mạnh, như bốn nhóm –OH gắn trên khung flavon và nhiều nhóm –OH trong phần đường glucose và rhamnose.



(A): Flavon có tính phân cực trung bình



(B): Flavon có tính phân cực mạnh

- Sơ đồ 1 là qui trình căn bản điều chế các loại cao có độ phân cực khác nhau. Trong thực tế, nhất là trong các phòng thí nghiệm có kinh phí hạn chế, muốn nghiên cứu thành phần hóa học các hợp chất có trong cây, người ta thường sử dụng ngay dung môi vạn năng là etanol hoặc metanol (do có giá rẻ) để chiết kiệt hết các hợp chất có trong bột cây. Sau khi đuổi dung môi, thu được cao alcol thô. Từ cao etanol thô chứa tất cả các loại hợp chất hữu cơ có trong cây, sử dụng kỹ thuật chiết rắn-lỏng hoặc chiết lỏng-lỏng (trình bày tiếp liền sau) với các loại dung môi có tính phân cực khác nhau để điều chế các loại cao có độ phân cực khác nhau.

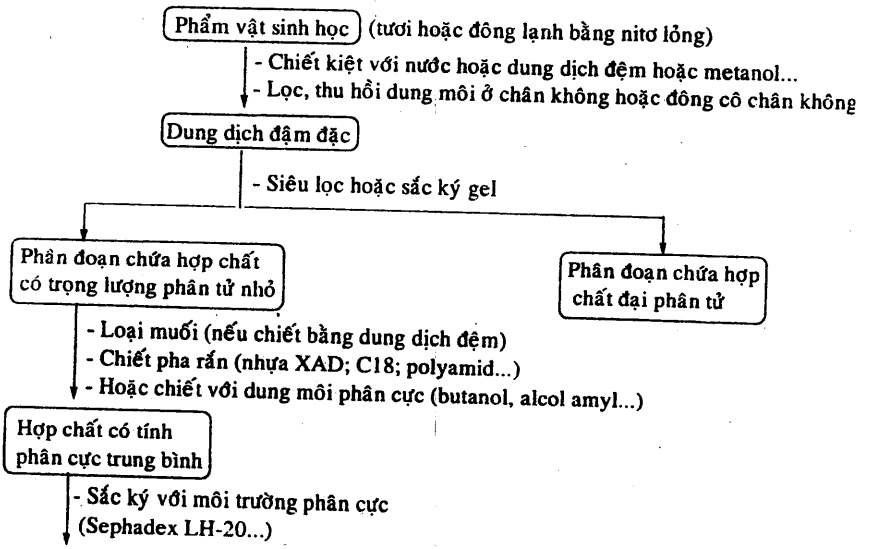
Nhắc lại rằng, nếu chủ đích muốn nghiên cứu các chất béo trong cây (các alcan, alcol béo, ester béo...) tốt nhất nên sử dụng ngay eter dầu hỏa hoặc hexan.

1.5.2. Chiết hợp chất hữu cơ trọng lượng phân tử nhỏ, có tính ái nước (hydrophilic)

Khảo sát các kết quả công bố trên Chemical Abstracts về việc cô lập các hợp chất hữu cơ mới trong tự nhiên cho thấy có khoảng 95% các hợp chất mới là loại hợp chất có tính thân dầu (lyophilic; lipid-soluble category). Việc này cho thấy có vẻ như trong thiên nhiên số lượng hợp chất có tính thân dầu nhiều hơn hợp chất có tính ái nước, và điều này cũng cho thấy việc cô lập một hợp chất có trọng lượng phân tử nhỏ, có tính ái nước khó khăn hơn nhiều.

Trong phép chữa trị theo y học cổ truyền, người dân thường nấu cây thuốc với nước, còn được gọi là sắc thuốc, để có dung dịch chiết nước đậm đặc sử dụng làm thuốc uống chữa bệnh.

Sơ đồ 2: Sơ đồ tổng quát cô lập các hợp chất có tính thân nước – trọng lượng phân tử nhỏ



Trong phòng thí nghiệm, muốn chiết các hợp chất có tính ái nước, người ta nghĩ dung môi phù hợp nhất để chiết những hợp chất này ra khỏi nguyên liệu ban đầu chính là nước vì điều này theo đúng nguyên tắc "*các chất giống nhau sẽ hòa tan nhau*". Tuy nhiên, trong thực tế nhiều trường hợp sử dụng dung môi nước để chiết các phẩm vật sinh học tươi (fresh biological material) bằng phương pháp ngâm dầm (maceration) đã thất bại, không thể chiết các hợp chất có trọng lượng phân tử nhỏ-có tính ái nước ra khỏi nguyên liệu thực vật, dù rằng chiết với nước là phương pháp giống với cách dân gian nấu cây cỏ để có nước thuốc sắc, uống để chữa bệnh.

Có một số khó khăn khi chiết bằng dung môi là nước, như sau.

- Nước có nhiệt độ sôi khá cao, áp suất hơi lại nhỏ nên sau khi chiết, rất khó đuổi nước ra khỏi dung dịch chiết. Muốn đuổi nước mà vẫn bảo đảm chất lượng sản phẩm thì tốt nhất nên sử dụng kỹ thuật đông cô chân không (lyophilization) với máy rất đắt tiền.

- Nước không thể chiết được hợp chất có trọng lượng phân tử nhỏ–có tính ái nước là do các hợp chất này hiện diện trong cây cỏ ở trong trạng thái được bảo vệ. Sự bảo vệ rất đa dạng: hợp chất bám dính vào màng tế bào, được trữ ở bên trong tế bào thực vật, được che chắn bên ngoài bởi các nguyên vật liệu có tính ái dầu ..... Có thể khắc phục các khó khăn nêu trên bằng cách sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp các kỹ thuật sau: sử dụng chậu siêu âm (sonication: erlen có chứa dung dịch chiết được đặt vào một chậu siêu âm trong vài phút); đun nóng; đông khô chân không; cho tiêu hủy bởi enzym.

Điều này không xảy ra khi chiết các hợp chất có tính thân dầu bởi vì các dung môi hữu cơ có khả năng phá hủy màng tế bào thực vật.

- Dung dịch nước chiết là môi trường tốt cho sự phát triển các vi sinh vật: sau một thời gian tồn trữ dung dịch nước sẽ bị lên mốc. Muốn tránh điều này phải giữ dung dịch chiết trong phòng lạnh hoặc cho thêm hoạt chất kháng nấm mốc vào dung dịch này thí dụ như chất azid natri, NaN_3, tuy nhiên có tác giả đề nghị không nên sử dụng vì cho rằng azid natri ($Na^+ {}^-:N=^+N=N:^-$) do có các đôi điện tử tự do trên nitơ, có thể cho phản ứng hoá học với một vài loại hợp chất, để tạo ra dẫn xuất triaza.

- Sự chiết bằng nước cũng có thể chiết luôn một số enzym như peptidase, glycosidase, sulfatase, oxydase... Quá trình chiết nước đã làm hoạt hóa các enzym này vì thế nếu hợp chất cần khảo sát lại nhạy cảm với một trong các loại enzym do enzym phát huy tác dụng làm cắt đứt nối, hệ quả là sản phẩm thu nhận không còn giống như nguyên thủy của nó.

Một thí dụ điển hình là việc cô lập hợp chất glycosid trợ tim trong cây *Digitalis* là hai hợp chất purpurea glycosid A và purpurea glycosid B. Với phương pháp chiết nước thông thường, người ta chỉ cô lập được hai aglycon: digitoxin và gitoxin mà không thể chiết được hợp chất glycosid nguyên thủy, do men β-glusosidase đã cắt mất phần đường glucose của hợp chất glycosid. Tuy nhiên sẽ thu được glycosid nếu trước khi chiết đã làm bất hoạt (deactivation) hoặc làm biến tính (denaturation) các enzym đó bằng cách đun nóng nhanh hoặc xử lý với alcol. Các nghiên cứu cho thấy xử lý bằng alcol cũng không thể làm bất hoạt enzym vì thế tốt nhất là sử dụng phương pháp siêu lọc (ultrafiltration) hoặc sắc ký lọc gel (gel filtration) để nhanh chóng loại bỏ các phân đoạn có chứa các hợp chất có trọng lượng phân tử lớn, có chứa enzym.

Trong phòng thí nghiệm, muốn chiết các hợp chất có tính ái nước, người ta thường chọn một số dung môi hữu cơ có tính phân cực như etanol, metanol hoặc hỗn hợp metanol-nước hoặc etanol-nước... mặc dù có thể các dung môi này không phải là dung môi tối ưu để hòa tan hợp chất đang mong muốn chiết. Các dung môi này được lựa chọn vì chúng dễ chưng cất thu hồi hơn so với nước.

Trong đa số trường hợp, muốn chiết (*hoặc tách cao chiết thô thành các phân đoạn khác nhau*) hợp chất hữu cơ trọng lượng phân tử nhỏ-có tính ái nước người ta thường sử dụng dung dịch đệm. Tuy vậy, việc sử dụng dung dịch đệm cũng có nhược điểm như sau

- Muốn có thể chiết tốt các chất cần khảo sát, phải tìm cho ra được khoảng pH và nồng độ thích hợp của dung dịch đệm.

- Việc đuổi dung dịch đệm ra khỏi dung dịch để thu được cao chiết khô gặp nhiều khó khăn. Để khắc phục việc này, có thể sử dụng một số loại dung dịch đệm có khả năng bay hơi, có thể được loại đi bằng kỹ thuật đông cô

chân không (lyophilization) hoặc nhờ máy cô quay chân không, tuy vậy cũng không phải dễ dàng mà cần phải rửa nhiều lần với nước để loại hoàn toàn chất của dung dịch đệm.

Một số loại dung dịch đệm được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3: Một vài loại dung dịch đệm có khả năng bay hơi.

Dung dịch đệm	pH
Amonium bicarbonat	5,0 – 7,0
Amonium acetat	7,0 – 8,0
Pyridin : acid acetic (16,1 : 278,5)	3,1
Pyridin : acid acetic (161,2 : 143,2)	5,0
Pyridin : acid acetic: α-picolin (11,8 : 0,1 : 28,2)	8,0
Pyridin : acid acetic: 2,4,5-collidine (10 : 0,4 : 10)	8,3
Pyridin : acid acetic: *N*-ethylmorpholine (7,5: 0,1–0,5 : 12,5)	9,3

2. CÁC KỸ THUẬT CHIẾT TÁCH HỢP CHẤT RA KHỎI CÂY

Có nhiều cách để chiết tách hợp chất hữu cơ ra khỏi cây cỏ. Các kỹ thuật đều xoay quanh hai phương pháp chính là chiết lỏng–lỏng và chiết rắn–lỏng.

Trong thực nghiệm, việc chiết rắn–lỏng được áp dụng nhiều hơn, gồm sự ngấm kiệt (percolation), sự ngâm dầm (maceration), sự trích với máy chiết Soxhlet... Sự chiết bằng cách nấu nguyên liệu cây với nước còn được gọi là nước sắc. Ngoài ra, còn có sự chiết với phương pháp lôi cuốn bằng hơi nước, phương pháp sử dụng chất lỏng siêu tới hạn (supercritical fluid method)....

2.1. Kỹ thuật chiết lỏng – lỏng (Liquid–liquid extraction)

Kỹ thuật này còn được gọi là sự chiết bằng dung môi (Solvent extraction). Cao alcol thô ban đầu (thí dụ bột cây được tận trích với metanol 80%, đuổi dung môi thu được cao alcol thô ban đầu) hoặc *dung dịch ban đầu* (thí dụ dung dịch sinh học) đều chứa hầu hết các hợp chất hữu cơ từ phân cực đến không phân cực vì thế rất khó cô lập được riêng những hợp chất tinh khiết để thực hiện các khảo sát tiếp theo. ***Kỹ thuật chiết lỏng–lỏng*** được áp

dụng để phân chia cao alcol thô ban đầu hoặc dung dịch ban đầu thành những phân đoạn có tính phân cực khác nhau.

Nguyên tắc của sự chiết là dung môi không phân cực (thí dụ eter dầu hỏa...) sẽ hoà tan tốt các hợp chất có tính không phân cực (thí dụ các alcol béo, ester béo...), dung môi phân cực trung bình (thí dụ dietyl eter, cloroform...) hoà tan tốt các hợp chất có tính phân cực trung bình (các hợp chất có chứa nhóm chức eter –O–, aldehyd –CH=O, ceton –CO–, ester –COO–...) và dung môi phân cực mạnh (thí dụ metanol...) hoà tan tốt các hợp chất có tính phân cực mạnh (các hợp chất có chứa nhóm chức –OH, –COOH...).

2.1.1. Kiến thức căn bản

Nguyên tắc căn bản của sự chiết lỏng – lỏng là ***sự phân bố*** (partition) của một chất tan (solute) vào hai pha lỏng và hai pha lỏng này không hòa tan vào nhau. Hằng số phân bố (partition coefficient) của một chất tan (solute) cho biết khả năng hòa tan của chất này đối với hai pha lỏng tại thời điểm cân bằng, được biểu diễn bằng *hằng số phân bố* K.

$$K = \frac{C_a}{C_b}$$

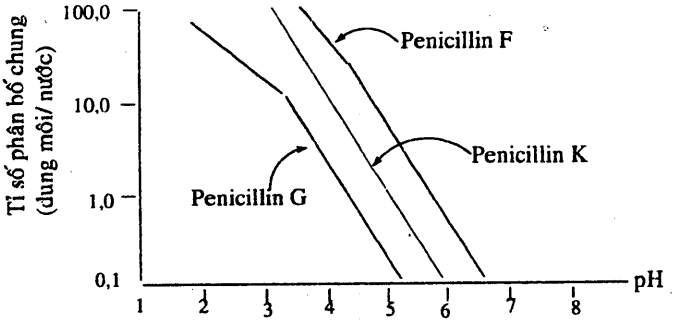
C_a = Nồng độ của chất tan trong pha (a) tại giai đoạn cân bằng
C_b = Nồng độ của chất tan trong pha (b) tại giai đoạn cân bằng

Mục đích chính của sự chiết bằng dung môi là để sơ bộ tinh chế hóa một hợp chất nào đó. Nếu một chất tan X hoặc những chất tương đồng với chất X này có hằng số phân bố lớn còn các chất tạp bẩn cũng như các chất khác có cấu trúc hóa học không tương đồng với X lại có hằng số phân bố nhỏ thì có thể áp dụng kỹ thuật chiết lỏng – lỏng để cô lập chất X và các chất tương đồng với nó (sau đó, sẽ tìm cách tách riêng chúng ra).

Hằng số phân bố của những chất tan tương đối ít thay đổi theo nhiệt độ hoặc nồng độ của chất tan đó có trong dung dịch ban đầu, tuy nhiên hằng số này thay đổi nhiều tùy vào dung môi (độ phân cực, đặc tính ái nước của dung môi) và dung dịch-nước (pH, lực ion). Riêng với dung dịch nước, pH của dung dịch có những ảnh hưởng quan trọng, nhất là ở pH acid yếu và ở pH base yếu.

Rất nhiều chất biến dưỡng thứ cấp như penicillin có hằng số phân bố khác hẳn nhau trong môi trường pH khác nhau, người ta đã dựa vào các tính chất này để chiết lấy chúng ra khỏi dung dịch ban đầu.

Hình 3 cho thấy một vài chất kháng sinh có hằng số phân bố khác nhau trong dung môi chiết có pH khác nhau để thấy pH của môi trường chiết giữ vai trò quan trọng.



Hình 3: Khả năng hòa tan khác nhau của một vài chất kháng sinh trong dung môi có pH khác nhau

Bảng 4: Điều kiện pH của dung môi để chiết một số chất kháng sinh theo kỹ thuật chiết lỏng-lỏng.

Sản phẩm	Dung dịch ban đầu	Dung môi chiết	pH dung môi chiết
Acid clavulanic	Môi trường đã loại bỏ tế bào	*n*-Butanol	2,0
Penicillin G	Môi trường đã loại bỏ tế bào	Acetat butyl + Amyl acetat	2,0
Adrianimycin	Tế bào nuôi cấy đã lọc bỏ môi trường	Aceton	Acid
Cycloheximid	Môi trường đã loại bỏ tế bào	Aceton –cloroform	Acid
Virginiamycin	Môi trường đã loại bỏ tế bào	Metyl isobutyl ceton	Acid
Actinomycin	Tế bào nuôi cấy đã lọc bỏ môi trường	Metanol: diclorometan (1:2)	2,5

Nisin	Môi trường đã loại bỏ tế bào	diclorometan + Octanol	4,5
Acid fusidic	Môi trường đã loại bỏ tế bào	Metyl isobutyl ceton	6,8
Bacitracin	Môi trường đã loại bỏ tế bào	*n*-Butanol	7,0
Griseofulvin	Môi trường đã loại bỏ tế bào	Butyl acetat	Trung hòa
Ethromycin	Môi trường đã loại bỏ tế bào	Amyl acetat	Kiềm
Macrolid	Môi trường đã loại bỏ tế bào	Metyl isobutyl ceton + etyl acetate	Kiềm
Salomycin	Môi trường đã loại bỏ tế bào	Butyl acetat	9,0

Bảng 4 trình bày các chất kháng sinh (sản phẩm y dược), là những chất acid yếu hoặc base yếu, đã được chiết ra khỏi môi trường nuôi cấy tế bào bằng dung môi có pH xác định.

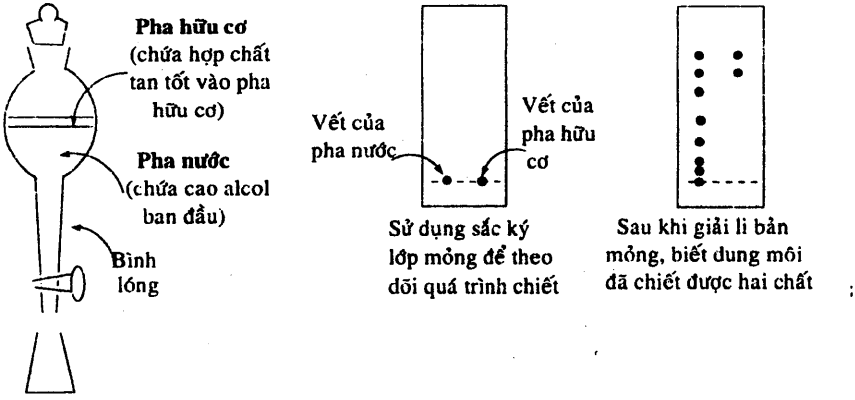
2.1.2. Quá trình thực hành sự chiết lỏng – lỏng (Hình 4)

Kỹ thuật chiết lỏng–lỏng thường được áp dụng để

* Chiết hợp chất cần quan tâm ra khỏi dung dịch ban đầu.

* Phân chia cao alcol thô ban đầu có chứa quá nhiều loại hợp chất từ không phân cực đến rất phân cực thành những phân đoạn có tính phân cực khác nhau.

Trong trường hợp này, cao alcol thô ban đầu có dạng sệt dẻo hoặc dạng bột khô, trong khi đó kỹ thuật chiết lỏng–lỏng cần có một pha nước để làm pha căn bản, vậy cần hoà tan cao alcol thô này vào nước. Trong thực nghiệm, cao alcol thô thường hòa tan rất kém trong nước, để khắc phục điều này, trước tiên phải hòa cao alcol vào một lượng tối thiểu etanol, tiếp theo rót dung dịch etanol này vào một lượng lớn nước.



Hình 4: Kỹ thuật chiết lỏng–lỏng (Partition)

Việc chiết lỏng–lỏng được thực hiện bằng bình lóng, trong đó cao alcol thô ban đầu được hòa tan vào pha nước. Sử dụng lần lượt các dung môi hữu cơ, loại không hòa tan với nước hoặc loại có thể hỗn hợp được với nước, để chiết ra khỏi pha nước các hợp chất có tính phân cực khác nhau (tùy vào độ phân cực của dung môi). Tùy vào tỉ trọng so sánh giữa dung môi và nước mà pha hữu cơ nằm ở lớp trên hoặc ở dưới so với pha nước.

Việc chiết được thực hiện lần lượt từ dung môi hữu cơ kém phân cực đến dung môi phân cực thí dụ như: eter dầu hỏa hoặc hexan, eter etyl, cloroform, etyl acetat, butanol... Với mỗi loại dung môi hữu cơ, việc chiết được thực hiện nhiều lần, mỗi lần một lượng nhỏ thể tích dung môi; chiết đến khi không còn chất hòa tan vào dung môi thì đổi sang chiết với dung môi có tính phân cực hơn. Dung dịch của các lần chiết được gom chung lại, làm khan nước với các chất làm khan như Na_2SO_4, $MgSO_4$, $CaSO_4$, ..., đuổi dung môi, thu được cao chiết.

Muốn kiểm tra xem các hợp chất nào đã được chiết vào pha hữu cơ cũng như các hợp chất nào còn ở lại trong pha nước và chiết bao nhiêu lần thì hoàn tất... có thể sử dụng sắc ký lớp mỏng; trên bản mỏng cần so sánh đồng thời vết của pha nước và của pha hữu cơ. Sự chiết bởi một dung môi cụ thể nào đó được gọi là hòan tất khi lần chiết thứ n, trên bản mỏng không còn nhìn

thấy vết của chất đó trong pha nước cũng như trong pha hữu cơ. Cũng có thể kiểm tra bằng cách nhỏ một giọt dung dịch chiết lần thứ *n* lên trên một tấm kiếng sạch, sau khi bay hết dung môi, không còn để lại vết gì trên mặt kiếng.

Cần lưu ý rằng sự chiết lỏng-lỏng được thực hiện ở nhiệt độ phòng, nếu gia tăng nhiệt độ cho dung môi thì khả năng hòa tan của dung môi sẽ tăng lên và nguyên tắc nêu trên sẽ có nhiều sự thay đổi.

Kỹ thuật chiết lỏng-lỏng có nhược điểm là do phải lắc bình lóng nhiều lần, nên ở những lần chiết sau, dung môi trong bình lóng tạo nhũ tương, gây khó khăn trong việc tách pha thành hai lớp. Để khắc phục nhược điểm này, có thể sử dụng các cách như trình bày sau, hoặc sử dụng phương pháp trích pha rắn (solid phase extraction).

2.1.3. Một vài đặc điểm cần lưu ý khi sử dụng dung môi trong sự chiết lỏng – lỏng

✻ Khi dung môi trong bình lóng tạo nhũ tương, sử dụng một đũa thủy tinh dài đưa vào trong bình lóng, khuấy nhẹ dung dịch hoặc cọ xát nhẹ vào thành bình, chỗ mặt thoáng của dung dịch nhằm phá vỡ các bọt khí để dung dịch nhanh chóng phân thành hai lớp. Cũng có thể phá bọt bằng cách ly tâm dung dịch.

✻ Muối NaCl làm giảm sự hoà tan vào nhau giữa acetonitril và nước. Một lượng tối thiểu khoảng 20 g NaCl được cho vào một lít dung dịch gồm acetontril: nước (1:1) sẽ làm dung dịch này tách thành hai lớp, lớp trên với lượng thể tích nhỏ là acetonitril, lớp dưới với lượng thể tích nhiều là nước. Nếu tiếp tục cho thêm NaCl vào hỗn hợp dung dịch nói trên thì lớp acetontril càng tách ra càng nhiều.

✻ Acetonitril có hằng số phân chia mạnh đối với toluen. Một lượng tối thiểu khoảng 25 ml toluen được cho vào một lít dung dịch gồm acetonitril: nước (1:1) sẽ làm dung dịch này tách thành hai lớp, lớp trên với lượng thể tích 200 ml là acetonitril, lớp dưới với lượng thể tích 825 ml là nước. Nếu tiếp tục cho thêm toluen vào hỗn hợp dung dịch nói trên, lớp acetonitril càng tách ra càng nhiều.

* Độ hòa tan của một vài hợp chất thay đổi đáng kể khi có sự hiện diện của nước. Thí dụ độ hòa tan của hợp chất immunomycin trong metanol giảm từ 400 g/L xuống còn 40g/L khi lượng nước tăng từ 0% lên 25%.

2.2. KỸ THUẬT CHIẾT RẮN – LỎNG

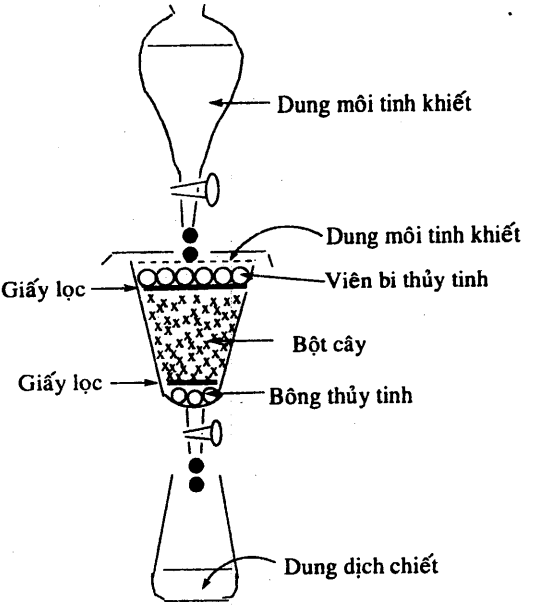
2.2.1. Kỹ thuật chiết ngấm kiệt (Percolation) (Hình 5)

Phương pháp được sử dụng phổ biến vì không đòi hỏi thiết bị tốn kém, phức tạp.

* *Dụng cụ*: gồm một bình ngấm kiệt bằng thủy tinh, hình trụ đứng, dưới đáy bình là một van khoá để điều chỉnh vận tốc của dung dịch chảy ra; một bình chứa đặt bên dưới để hứng dung dịch chiết. Phía trên cao của bình ngấm kiệt là bình lóng để chứa dung môi tinh khiết.

* *Thực hành*: Bột cây được xay thô, lọt được qua lỗ rây 3 mm. Mẫu không nên to hơn vì sẽ chiết không kiệt, mẫu được xay quá mịn hoặc mẫu có tính nhầy nhựa hoặc có thể trương nở... sẽ cản trở dòng chảy. Đáy của bình ngấm kiệt được lót bằng bông thủy tinh và một tờ giấy lọc. Bột cây được đặt vào bình, lên trên lớp bông thủy tinh, lên gần đầy bình. Đậy bề mặt lớp bột bằng một tờ giấy lọc và chặn lên trên bằng những viên bi thủy tinh để cho dung môi không làm xáo trộn bề mặt lớp bột. Từ từ rót dung môi cần chiết vào bình cho đến khi dung môi phủ xấp xấp phía trên lớp mặt. Có thể sử dụng dung môi nóng hoặc nguội.

Để yên sau một thời gian, thường là 12 -24 giờ. Mở van bình ngấm kiệt cho dụng dịch chiết chảy ra từng giọt nhanh và đồng thời mở khóa bình lóng để dung môi tinh khiết chảy xuống bình ngấm kiệt. Điều chỉnh sao cho vận tốc dung môi tinh khiết chảy vào bình ngấm kiệt bằng với vận tốc dung dịch chiết chảy ra khỏi bình này.



Hình 5: Kỹ thuật chiết ngấm kiệt (Percolation)
(Vận tốc dung môi chảy vào bình chứa bột cây bằng vận tốc dung môi chảy ra)

✱ *Hiệu quả của phương pháp*: So sánh với phương pháp ngâm dầm, phương pháp này đòi hỏi thiết bị phức tạp hơn một chút nhưng hiệu quả lại cao hơn và ít mất công hơn, vì đây là quá trình chiết liên tục, dung môi trong bình ngấm kiệt đã bão hòa mẫu chất sẽ được liên tục thay thế bằng dung môi tinh khiết.

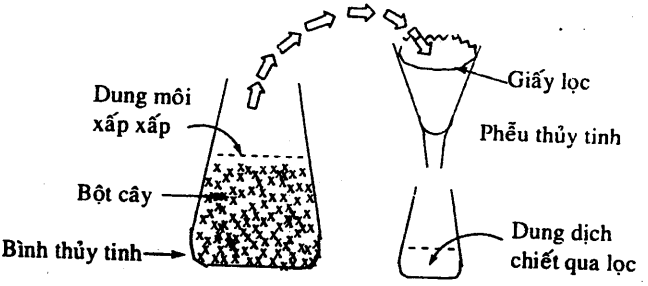
Kiểm tra việc chiết kiệt mẫu bột cây bằng sắc ký lớp mỏng hoặc nhỏ một giọt dung dịch chiết lên tấm kiếng sạch, để bốc hơi và xem có còn để lại vết gì trên mặt kiếng hay không, nếu không còn vết gì là đã chiết kiệt.

2.2.2. Kỹ thuật chiết ngâm dầm (Maceration) (Hình 6)

Kỹ thuật ngâm dầm cũng tương tự như kỹ thuật chiết ngấm kiệt nhưng không đòi hỏi thiết bị phức tạp, vì thế có thể dễ dàng thao tác với một lượng lớn mẫu cây. Ngâm bột cây trong một bình chứa bằng thủy tinh hoặc bằng thép không rỉ, bình có nắp đậy. Tránh sử dụng bình bằng nhựa vì dung môi

hữu cơ có thể hòa tan một ít nhựa, gây nhầm lẫn là hợp chất đó có chứa trong cây.

Rót dung môi tinh khiết vào bình cho đến xấp xấp bề mặt của lớp bột cây. Giữ yên ở nhiệt độ phòng trong một đêm hoặc một ngày, để cho dung môi xuyên thấm vào cấu trúc tế bào thực vật và hoà tan các hợp chất tự nhiên. Sau đó, dung dịch chiết được lọc ngang qua một tờ giấy lọc; thu hồi dung môi sẽ có được cao chiết. Tiếp theo, rót dung môi mới vào bình chứa bột cây và tiếp tục quá trình chiết thêm một số lần nữa cho đến khi chiết kiệt mẫu cây.



Hình 6: Kỹ thuật chiết ngâm dầm (Maceration)

Có thể gia tăng hiệu quả sự chiết bằng cách thỉnh thoảng đảo trộn, xốc đều lớp bột cây hoặc có thể gắn bình vào máy lắc để lắc nhẹ (chú ý nắp bình bị bung ra làm dung dịch chiết bị trào ra ngoài).

Mỗi lần ngâm dung môi, chỉ cần 24 giờ là đủ, vì với một lượng dung môi cố định trong bình, mẫu chất chỉ hòa tan vào dung môi đến đạt mức bão hòa, *không thể hòa tan thêm được nhiều hơn*; có ngâm lâu hơn chỉ mất thời gian. Nhắc lại qui tắc chiết là *chiết nhiều lần, mỗi lần một ít lượng dung môi.*

Dung môi sau khi được thu hồi, được làm khan nước bằng các chất làm khan và được tiếp tục sử dụng để chiết các lần sau.

2.2.3. Kỹ thuật chiết bằng máy chiết Soxhlet (Hình 7)

Máy có bán sẵn với nhiều cỡ lớn nhỏ khác nhau, từ bình cầu 250 ml đến 15 lít.

✱ ***Dụng cụ:*** máy gồm ba bộ phận tháo ráp được tại các vị trí nút mài (1), (2) và (3). Gồm một bình cầu A đặt trong một bếp đun có thể điều chỉnh nhiệt độ. Một bộ phận chứa mẫu bột cây, gồm ba ống: ống D có đường kính lớn, ở giữa, để chứa bột cây; ống B có đường kính trung bình, để dẫn dung môi từ bình A bay lên, đi vào ống D chứa bột cây; ống E có đường kính nhỏ, là ống thông nhau, để dẫn dung môi từ D trả ngược trở lại bình cầu A. Trên cao nhất là ống C ngưng hơi.

✱ ***Thực hành:*** Bột cây xay thô được đặt trực tiếp trong ống D hoặc tốt nhất là đặt trong một túi vải để dễ lấy bột cây ra khỏi máy. Lưu ý đặt vài viên bi thuỷ tinh dưới đáy ống D để tránh làm nghẹt lối ra vào của ống thông nhau E. Không được để lượng bột cây trong ống D cao vượt hơn mức cong của ống thông nhau E.

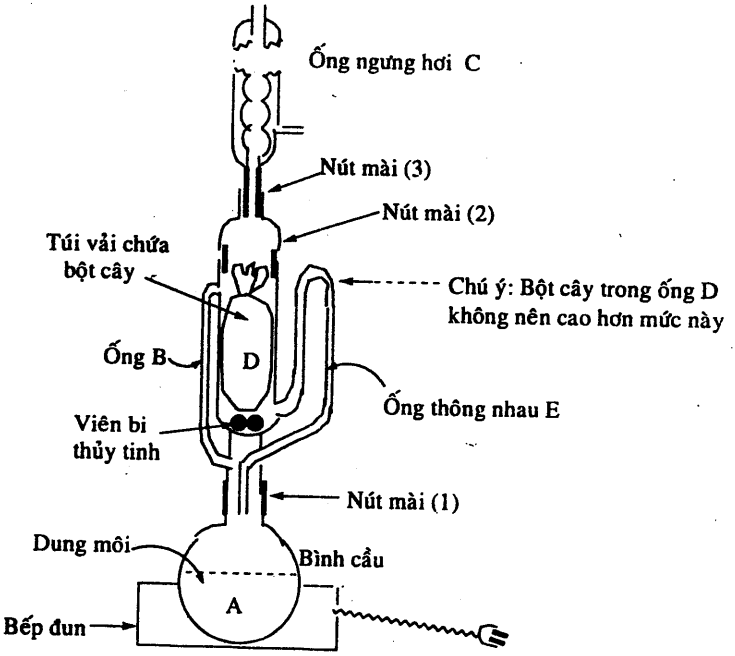
Rót dung môi đã lựa chọn vào bình cầu bằng cách tháo hệ thống ở chỗ nút mài số (2), như thế dung môi sẽ thấm ướt bột cây rồi mới chạy xuống bình cầu, ngang qua ngõ ống thông nhau E. Lưu ý để thể tích lượng dung môi trong bình cầu không được nhiều hơn hai phần ba thể tích của bình cầu.

Kiểm tra hệ thống kín. Mở cho nước chảy hoàn lưu trong ống ngưng hơi. Cắm bếp điện và điều chỉnh nhiệt sao cho dung môi trong bình cầu sôi nhẹ đều. Dung môi tinh khiết khi được đun nóng sẽ bốc hơi lên cao, theo ống B lên cao hơn, rồi theo ống ngưng hơi để lên cao hơn nữa, nhưng tại đây hơi dung môi bị ống ngưng hơi làm lạnh, ngưng tụ thành thể lỏng, rớt thẳng xuống ống D đang chứa bột cây. Dung môi ngấm vào bột cây và chiết những chất hữu cơ nào có thể hòa tan vào dung môi. Theo quá trình đun nóng, lượng dung môi rơi vào ống D càng nhiều, mức dung môi dâng lên cao trong ống D và đồng thời cũng dâng cao trong ống E, vì đây là ống thông nhau. Đến một mức cao nhất trong ống E, dung môi sẽ bị hút về bình cầu A, lực hút này sẽ rút hết lượng dung môi đang chứa trong ống D.

Bếp vẫn tiếp tục đun và một qui trình mới vận chuyển dung môi theo như mô tả lúc đầu. Các hợp chất được hút xuống bình cầu và nằm lại tại đó, chỉ có dung môi tinh khiết là được bốc hơi bay lên để tiếp tục quá trình chiết. Tiếp tục đến khi chiết kiệt chất trong bột cây (dung môi eter dầu hỏa chỉ chiết kiệt những chất kém phân cực nào có thể tan được trong eter dầu hỏa nóng).

Kiểm tra sự chiết kiệt bằng cách tắt máy để nguội và mở hệ thống chỗ nút mài (3), rút lấy một giọt dung môi và thử trên mặt kiếng, nếu thấy không còn vết gì trên kiếng là đã chiết kiệt.

Sau khi hoàn tất, lấy dung môi chiết ra khỏi bình cầu A, đuổi dung môi, thu được cao chiết.



Hình 7: Chiết bằng máy Soxhlet

Một số lưu ý

* Các hợp chất chiết được trữ trong bình cầu A, đến một lúc nào đó nồng độ của chất đạt đến mức bão hòa thì cần phải thay dung môi mới.

* Tuỳ trường hợp, việc chiết có thể kéo dài trong vài ngày. Muốn nghỉ, ra về, cần tắt bếp điện trước, chờ thêm ba mươi phút sau mới tắt ống nước làm lạnh ống ngưng hơi.

* Khi thực hiện sự chiết với dung môi có nhiệt độ sôi thấp, phòng thí nghiệm ở xứ nóng, cần lưu ý xem ống ngưng hơi có đủ sức làm ngưng tụ hơi hay không, nếu không, sẽ thấy khí bốc ra khỏi hệ thống từ đầu trên cao của ống ngưng hơi, trong trường hợp đó cần tìm cách nối dài thêm ống ngưng hơi. Lưu ý đây là *hệ thống hở*, phần bên trong của hệ thống thông với không khí bên ngoài nhờ ống ngưng hơi, vì thế khi nối dài ống ngưng hơi không được làm ống bị bít.

* Sau khi chiết kiệt với một loại dung môi, thí dụ với eter dầu hỏa, muốn tiếp tục chiết với một dung môi có tính phân cực hơn, thí dụ cloroform: rút bao chứa bột cây ra khỏi ống D, mở miệng bao cho dung môi bay hết, rồi cho bao trở lại vào ống D, rót dung môi mới là cloroform vào, bắt đầu qui trình chiết mới.

Ưu điểm của kỹ thuật

* Tiết kiệm dung môi, chỉ một lượng ít dung môi mà chiết kiệt được mẫu cây. Không phải tốn công lọc và châm dung môi mới.

* Không tốn các thao tác lọc và châm dung môi mới như các kỹ thuật khác. Chỉ cần cắm điện, mở nước hoàn lưu là máy sẽ thực hiện sự chiết.

* Chiết kiệt hợp chất trong bột cây vì bột cây luôn được liên tục chiết bằng dung môi tinh khiết.

Nhược điểm của kỹ thuật

* Kích thước của máy Soxhlet làm giới hạn lượng bột cây cần chiết. Máy loại lớn nhất với bình cầu dung tích mười lăm lít (15 lít), có thể chứa một lần đến 10 lít dung môi; ống D có thể chứa 800 gam bột cây xay nhỏ.

Với máy nhỏ hơn, chỉ có thể cho vào mỗi lần vài trăm gam bột cây, muốn chiết lượng lớn bột cây cần phải lặp lại nhiều lần.

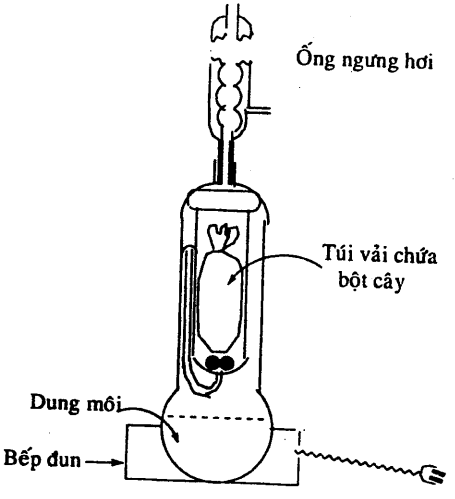
* Trong quá trình chiết, các hợp chất chiết ra từ bột cây được trữ lại trong bình cầu A, nên chúng luôn bị đun nóng ở nhiệt độ sôi của dung môi vì thế nếu có hợp chất nào kém bền nhiệt thí dụ như carotenoid có thể bị hư hại.

* Do toàn hệ thống của máy đều bằng thủy tinh và được gia công thủ công nên giá thành một máy khá cao. Máy bằng thủy tinh nên dễ vỡ, trong đó các bộ phận của máy, nhất là các nút mài do được gia công thủ công nên chỉ cần làm bể một bộ phận nào đó thì khó tìm được một bộ phận khác có thể vừa khớp để thay thế.

2.2.4. Kỹ thuật chiết bằng máy chiết Kumagawa (Hình 8)

Sử dụng máy chiết Kumagawa với thiết bị, nguyên tắc giống như máy chiết Soxhlet, chỉ khác ở túi đựng bột cây được đặt gần nguồn nhiệt hơn.

Có thể biến cải kỹ thuật này với những dụng cụ thủy tinh đơn giản có thể dễ dàng tìm được trong phòng thí nghiệm: bình cầu (ngâm bột cây trực tiếp trong bình này) và ống ngưng hơi. Sau một thời gian đun cần thiết, dung dịch chiết được rót ra và lọc ngang giấy lọc. Dung môi mới được cho vào bình cầu và tiếp tục chiết vài lần như thế đến khi chiết kiệt.



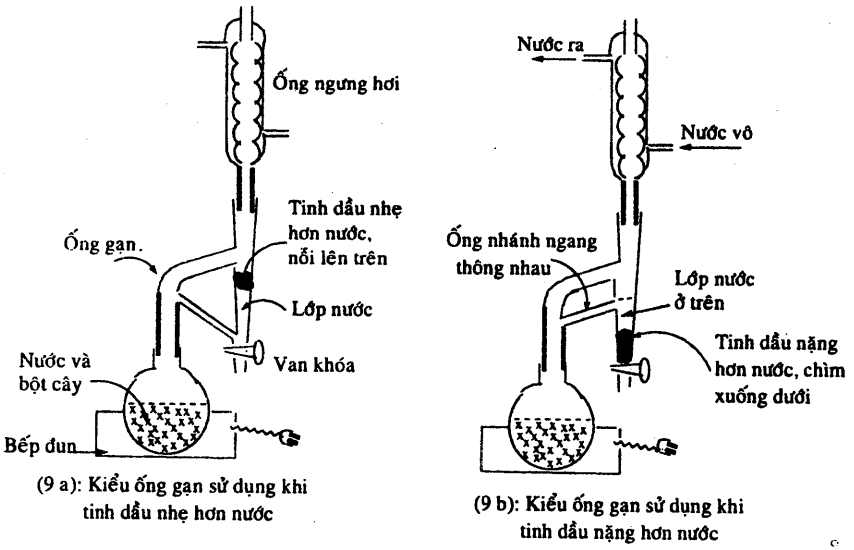
Hình 8: Chiết bằng máy Kumagawa

Ưu, nhược điểm: Do chiết nóng nên khả năng hòa tan của dung môi được gia tăng, có thể hòa tan tốt những hợp chất rất phân cực. Tuy vậy, bột cây luôn được ngâm trong dung môi nóng nên các hợp chất kém bền nhiệt có thể bị hư hại.

2.2.5. Kỹ thuật chiết bằng lôi cuốn theo hơi nước (Hình 9)

Kỹ thuật đặc trưng để chiết ra khỏi cây cỏ các loại hợp chất có tính chất bay hơi được, thí dụ như tinh dầu.

Muốn khảo sát tinh dầu của cây nên tiến hành việc lôi cuốn hơi nước trên mẫu cây tươi để tránh thất thoát tinh dầu vì tinh dầu có tính bay hơi. Các nghiên cứu cho thấy với mỗi loài cây, hàm lượng và thành phần hoá học của tinh dầu sẽ khác nhau tùy theo bộ phận của cây, thổ nhưỡng nơi cây mọc, thời gian để héo cây trước khi thực nghiệm cũng như kỹ thuật sử dụng để lấy tinh dầu ra khỏi cây.



(9 a): Kiểu ống gạn sử dụng khi tinh dầu nhẹ hơn nước

(9 b): Kiểu ống gạn sử dụng khi tinh dầu nặng hơn nước

Hình 9: Chiết bằng lôi cuốn hơi nước. Kiểu cải tiến Dean-Stark

✱ ***Dụng cụ:*** Có thể tự ráp lấy hệ thống lôi cuốn hơi nước kiểu cổ điển với những dụng cụ thủy tinh có sẵn trong phòng thí nghiệm (bình cầu, erlen, bếp đun, ống ngưng hơi, các ống nối bằng thủy tinh....) hoặc theo kiểu cải tiến Dean-Stark (là tên của hai nhà khoa học) với nguyên tắc giống như kiểu cổ điển nhưng hệ thống gọn gàng hơn, nhờ sử dụng một ống gạn. Kiểu cải tiến Dean-Stark có hai loại ống gạn: để sử dụng với loại tinh dầu nhẹ hơn nước (hình 9a) hoặc loại nặng hơn nước (hình 9b). Trên thành ống gạn có khắc các vạch (mL) để giúp biết ngay thể tích tinh dầu vừa được lôi cuốn.

✱ ***Thực hành:*** Sự lôi cuốn hơi nước thường được thực hiện trên cây tươi mới thu hái về Mẫu cây được cắt nhuyễn, được đặt vào bình cầu, cho nước cất vào bình sao cho phần thể tích của cả mẫu cây và nước chỉ chiếm tối đa hai phần ba thể tích bình cầu. Lắp hệ thống và cắm bếp điện đun nóng.

Nước trong bình cầu khi bị đun nóng sẽ bốc thành hơi bay lên, hơi nước bay lên mang theo tinh dầu, hơi này bị ống ngưng hơi làm lạnh, ngưng tụ trở lại thể lỏng, rớt xuống ống gạn. Trong ống gạn, dung dịch tách thành hai lớp gồm lớp nước và lớp tinh dầu. Tuỳ theo các tài liệu cho biết loài thực vật khảo sát có chứa tinh dầu loại nặng hoặc nhẹ hơn nước, khi ráp hệ thống sẽ lựa chọn ống gạn cho phù hợp. Vẫn tiếp tục đun nóng hệ thống, lớp nước trong ống gạn càng lúc càng nhiều lên, sẽ được trả về bình cầu nhờ ống nhánh ngang thông nhau. Nhờ ống này mà không cần phải tiếp thêm nước cho hệ thống trong suốt quá trình chưng cất so với kiểu cổ điển. Chỉ cần mở khoá ống gạn là có thể thu lấy tinh dầu.

Một số lưu ý: Lớp tinh dầu thu được từ ống gạn luôn có chứa một lượng nhỏ nước, cần phải được xử lý bằng cách hòa tan vào dietyl eter, làm khan nước, lọc và đuổi dung môi.

Phần lớn tinh dầu đều tan một phần trong nước, vì vậy để biết chính xác về thu suất của tinh dầu trong cây cần phải sử dụng dietyl eter và bình lóng để chiết lớp nước lôi cuốn được. Phần dietyl eter sau khi chiết được gộp lại, làm khan nước bằng Na_2SO_4 rồi thu hồi dung môi sẽ cho thêm lượng tinh dầu.

Tinh dầu được khảo sát bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS) để biết được tinh dầu chứa bao nhiêu cấu tử, mỗi cấu tử chiếm tỉ lệ

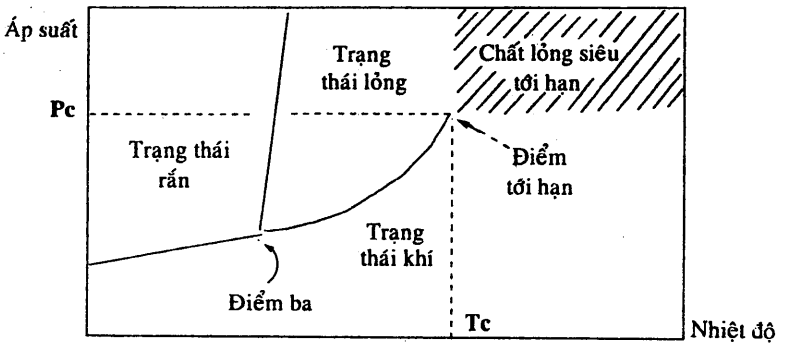
phần trăm là bao nhiêu so với toàn thể tinh dầu và cấu trúc hóa học của mỗi cấu tử (nếu thư viện máy GC-MS có mẫu chuẩn).

2.2.6. Chiết bằng chất lỏng siêu tới hạn (supercritical fluid method).

Tuy đã được biết đến cách đây rất lâu (1879) nhưng mãi đến thập niên 1980, phương pháp chiết bằng chất lỏng siêu tới hạn mới được áp dụng rộng rãi trong kỹ nghệ để chiết các hợp chất thiên nhiên ra khỏi thực vật như tinh dầu cà phê, trà, gia vị và nhất là hoa bia (hop).

So với các kỹ thuật cổ điển như chiết rắn-lỏng với dung môi hoặc chiết bằng lôi cuốn hơi nước thì phương pháp này có nhiều ưu điểm hơn, như sử dụng ít dung môi, có tính chọn lọc cao các loại hợp chất cần chiết tách, chất chiết được tương đối sạch, ít làm hư hại chất cần chiết và nhất là thân thiện với môi trường.

Một hợp chất sẽ hiện diện ở *trạng thái siêu tới hạn* (supercrical state) khi hợp chất đó có nhiệt độ và áp suất cao hơn *giá trị tới hạn* (critical value) tương ứng của nó.



Hình 10: Giản đồ pha cho biết liên quan giữa áp suất và nhiệt độ của một chất tinh khiết.

Hình 10 là gián đồ pha của một đơn chất tinh khiết. Giản đồ cho biết khi nào hợp chất ở trạng thái rắn, lỏng hoặc khí. *Điểm ba* (triple point) là nơi mà ba trạng thái giao nhau. Các đường cong là nơi hai trạng thái cùng hiện diện. Quan sát dọc theo "đường cong khí-lỏng", hướng lên cao, sẽ gặp một

điểm, nơi đó nồng độ của khí và lỏng bằng nhau. Điểm này được gọi là *điểm siêu tới hạn* (supercritical point) và hợp chất lúc đó được mô tả là *chất lỏng siêu tới hạn* (supercritical fluid). Tại điểm tới hạn, áp suất và nhiệt độ có các giá trị được gọi lần lượt là áp suất tới hạn (Pc) và nhiệt độ tới hạn (Tc); hai giá trị này là đặc trưng của từng loại hợp chất.

Khả năng hoà tan của chất lỏng siêu tới hạn có mối quan hệ chặt chẽ với tỉ trọng của nó và yếu tố này làm cho chất lỏng siêu tới hạn là loại chất lỏng hoàn hảo thích hợp để sử dụng trong kỹ thuật chiết các hợp chất thiên nhiên.

Một vài hợp chất thích hợp có thể sử dụng trong phương pháp chiết siêu tới hạn được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5: Giá trị nhiệt độ và áp suất tới hạn của một vài hợp chất có thể sử dụng trong phương pháp chiết siêu tới hạn.

Hợp chất	Nhiệt độ tới hạn Tc (K)	Áp suất tới hạn Pc (bar)	Thừa số lệch tâm ω
CO_2	304	74	0,225
Nước	647	221	0,344
Etan	305	49	0,099
Etylen	282	50	0,089
Propan	370	43	0,153
Xenon	290	58	0,008
Ammoniac	406	114	0,250

Thừa số lệch tâm ω (Acentric factor): một hợp chất có dạng hình cầu đến mức nào.

Trong các hợp chất đã khảo sát, dioxid carbon (CO_2) được sử dụng phổ biến nhất vì nó có áp suất và nhiệt độ tới hạn thấp, giá tiền rẻ, bền về mặt hóa học, không độc, không dễ cháy, có độ nhớt thấp, khả năng khuếch tán cao (so với chất lỏng) nên được chọn sử dụng trong phương pháp chiết siêu tới hạn để chiết hợp chất ra khỏi cây cỏ. Một ưu điểm nữa là dễ loại CO_2 ra khỏi hỗn hợp dung dịch chiết chỉ đơn giản bằng cách giảm áp suất. Mặc dù nó là loại dung môi không phân cực nhưng nó vẫn có ái lực ở mức độ nào đó

đối với các hợp chất phân cực. Để có thể làm tăng thêm tính phân cực cho nó, đôi khi người ta trộn CO_2 với hợp chất có tính phân cực là metanol (chỉ thêm 1-5 mol %).

✱ ***Dụng cụ*** (Hình 11)

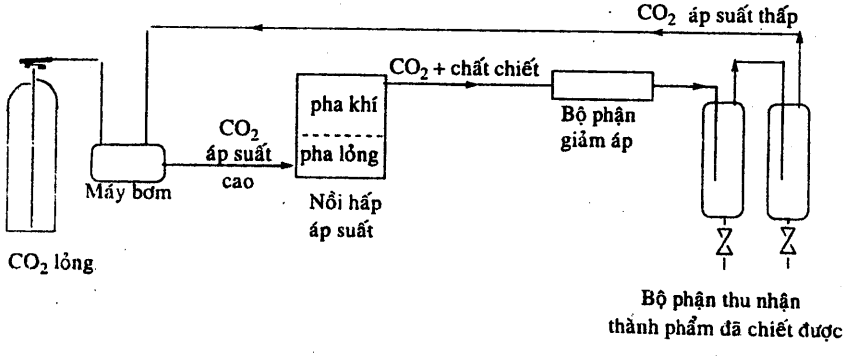
Hệ thống gồm một nguồn cung cấp CO_2, một máy bơm, một nồi hấp áp suất để chứa mẫu cần chiết, một bộ phận thu nhận mẫu đã chiết được. Với các bộ phận vừa mô tả người ta có thể tự ráp lấy một hệ thống, tuy nhiên các nhà sử dụng thường mua trọn một bộ.

- Khí CO_2 loại tinh khiết, không được lẫn nước, hydrocarbon, halocarbon...

- Máy bơm tạo được áp suất cao và giữ được áp suất này không đổi, để có thể đưa CO_2 đạt được trạng thái siêu tới hạn.

- Bộ phận chứa mẫu cần chiết: là thùng bằng thép không gỉ, chịu đựng được áp suất và nhiệt độ cao, có gắn bộ phận kiểm tra áp suất và nhiệt độ, thường đây là nồi hấp áp suất (autoclave).

- Bộ phận giảm áp và bộ phận nhận mẫu.



Hình 11: Sơ đồ hệ thống chiết siêu tới hạn CO_2.

✱ ***Thực hành***: Mẫu chiết có thể là cây cỏ hoặc dung dịch lên men vi sinh vật. Nếu là mẫu cây, cần xay nhỏ để việc chiết được thực hiện nhanh chóng.

Hỗn hợp rắn cần chiết được đặt vào một nồi hấp áp suất ở nhiệt độ phòng. Nồi này được khoá chặt lại và cho luồng khí CO_2 sục vào để đuổi hết không khí ra khỏi nồi. Khi nồi hấp áp suất được đun lên đến nhiệt độ mong muốn và được chỉnh áp suất đến 300 ± 5 bar, cho chất lỏng siêu tới hạn CO_2 đi ngang qua mẫu chiết đặt trong nồi và ra khỏi nồi để đi đến bộ phận giảm áp. Tại bộ phận giảm áp, áp suất bị hạ xuống đưa đến hệ quả là *chất lỏng* siêu tới hạn CO_2 biến thành *khí* CO_2, khí này được dẫn trả về máy bơm để tiếp tục quá trình chiết, còn chất chiết sẽ kết tủa xuống và được dẫn vào bộ phận tiếp nhận thành phẩm đã chiết được.

Có loại thiết bị cấu tạo bộ phận nhận mẫu rời, có loại cấu tạo với bộ phận nhận mẫu được nối trực tiếp vào máy sắc ký khí hoặc máy HPLC, để có thể khảo sát ngay sản phẩm vừa thu nhận được.

Một số lưu ý

- *Điều chỉnh mẫu cần chiết*: Trong một vài trường hợp đặc biệt, mẫu cần chiết có thể được điều chỉnh pH, hoặc thêm dung môi hoặc làm cho thấm ướt. Nếu hợp chất chiết có tính phân cực, một lượng nhỏ nước thêm vào để làm thấm ướt mẫu cần chiết sẽ giúp việc chiết thêm dễ dàng. Nếu hợp chất chiết có tính không phân cực, một lượng nhỏ dầu hoặc chất béo trộn thêm vào mẫu chiết sẽ giúp việc chiết thêm dễ dàng.

- *Chất cho thêm* (modifier): CO_2 chỉ phù hợp để chiết các hợp chất có tính chất từ không phân cực đến phân cực trung bình, nên nếu muốn chiết hợp chất có tính phân cực, cần bổ sung chất thêm như: metanol, clorur metylen, aceton...

Ưu điểm của phương pháp chiết bằng chất lỏng siêu tới hạn

✱ Chất lỏng siêu tới hạn có khả năng khuếch tán thấm vào bên trong mẫu chiết nhiều hơn so với sự chiết bằng dung môi bằng các phương pháp khác.

✱ Có độ nhớt thấp, có áp suất hơi cao hơn so với bất kỳ dung môi lỏng thông dụng nào.

✳ Có sự chọn lọc cao đối với loại hợp chất cần muốn chiết ra khỏi cây cỏ, vì thế thu được chất chiết tương đối sạch, ít lẫn các loại hợp chất khác mà phần nghiên cứu không quan tâm đến.

✳ Tính chất kém phân cực của dioxid carbon có thể được bổ sung bởi chất thêm vào (modifier)

✳ Phù hợp với loại hợp chất nhạy với nhiệt độ.

✳ Phương pháp thân thiện với môi trường.

Nhược điểm của phương pháp:

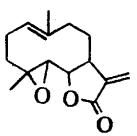
✳ Phải mua sắm thiết bị chuyên dùng, đắt tiền.

✳ Sự hiện diện của nước trong mẫu chiết thường hay gây khó khăn cho sự chiết, tuy nhiên trong một vài nghiên cứu, các tác giả nhận thấy việc thấm ướt mẫu chiết có thể giúp sự chiết được dễ dàng hơn.

✳ Phương pháp chiết siêu tới hạn không thích hợp với mẫu chiết ở dạng lỏng, vì rất khó giữ ổn định cùng lúc hai pha ở áp suất cao. Nếu mẫu là dạng keo (gel), dạng lỏng, cần phải cố định mẫu này lên trên một chất mang rắn (a solid support) thí dụ đất sét (diatomaceous earth) hoặc tẩm mẫu lên tờ giấy lọc, rồi mới đặt vào nồi hấp áp suất.

✳ Khó lường được việc chiết trên một loại mẫu mới, cần phải có nhiều nghiên cứu mới có thể tìm được các thông số tối ưu để chiết thành công. Có một vài loại hợp chất không phù hợp để áp dụng phương pháp này.

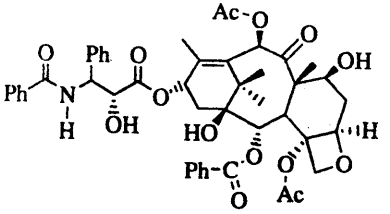
Thí dụ có nghiên cứu[2] so sánh việc chiết bằng chất lỏng siêu tới hạn và chiết bằng lôi cuốn hơi nước áp dụng trên một loài cỏ (feverfew plant), thu được kết quả như sau: chiết bằng lôi cuốn hơi nước thu được các terpen có tính bay hơi, còn chiết bằng chất lỏng siêu tới hạn thu được hợp chất sesquiterpen lacton tên là parthenolid và những lacton có tính kém bay hơi (less-volatile lactones).



Parthenolid
(Hợp chất loại sesquiterpen lacton)

✱ Phương pháp chiết bằng chất lỏng siêu tới hạn thường sử dụng dung môi là CO_2, nên không phù hợp để chiết các hợp chất có tính phân cực. Muốn cải thiện tính phân cực của dioxid carbon cần bổ sung chất thêm vào (modifier).

Taxol là một hợp chất loại diterpen phức tạp, chiết xuất từ cây thông đỏ *Taxus brevifolia*, đã được bào chế thành thuốc, hiện đang được sử dụng để chữa trị rất hiệu quả bệnh ung thư vú, ung thư tử cung.



Taxol chữa trị bệnh ung thư vú, tử cung (chiết từ cây thông đỏ *Taxus brevifolia*)

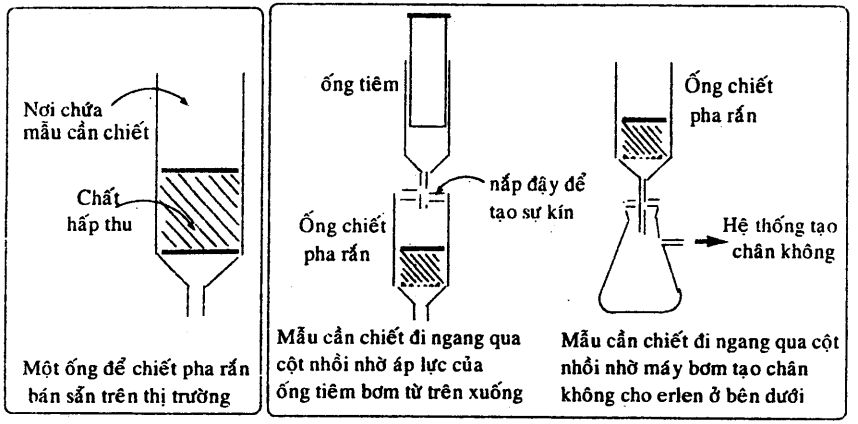
Tác giả Jennings R.M.[3] áp dụng phương pháp chiết bằng chất lỏng siêu tới hạn để cô lập hợp chất taxol từ vỏ của cây thủy tùng Thái bình dương (Pacific yew tree), nhận thấy nếu chiết bằng chất lỏng siêu tới hạn CO_2 thì thu được 25% lượng taxol có trong cây, còn nếu chiết bằng chất lỏng siêu tới hạn với hỗn hợp CO_2–metanol, thu được 50% lượng taxol có trong cây.

2.2.7. Kỹ thuật chiết pha rắn (Solid phase extraction, viết tắt là SPE)

Chiết pha rắn có nguyên tắc cơ bản giống như sắc ký cột, đó là sự tương tác giữa chất các chất tan (solutes) trong một dung dịch lên trên chất hấp thu (adsorbent). Kỹ thuật này cũng sử dụng các chất hấp thu giống như loại sử dụng trong sắc ký cột, gồm chất hấp thu pha thường, pha đảo và trao đổi ion.

Kỹ thuật chiết pha rắn thường được áp dụng để đạt các mục đích khác nhau, một số được trình bày như sau.

• Để xác định mức độ phân cực của một hợp chất chưa biết: thí dụ nếu hợp chất khảo sát bị giữ lại trong một cột pha đảo, hợp chất đó có tính kém phân cực.



Hình 12: Ống để chiết pha rắn có bán sẵn trên thị trường

• Để làm đậm đặc một hợp chất đang ở trong một dung dịch rất loãng và lượng thể tích lớn: thí dụ mẫu thuốc trị bệnh đã trao đổi chất có chứa trong mẫu huyết tương, chất gây ô nhiễm có trong nước biển. Thực hiện bằng cách chọn chất hấp thụ có thể giữ chất cần khảo sát lại trong cột. Cho tất cả lượng thể tích dung dịch có chứa chất khảo sát đi ngang qua cột, chất cần khảo sát bị giữ lại trong cột, còn các chất tạp bẩn khác sẽ đi ngang qua cột để loại bỏ. Cuối cùng sử dụng một lượng nhỏ dung môi phù hợp để đuổi chất khảo sát ra khỏi cột, như thế sẽ có một dung dịch đậm đặc chất khảo sát.

• Để phân chia cao thô ban đầu (có chứa tất cả các loại hợp chất từ không phân cực đến phân cực) thành các phân đoạn có tính phân cực khác nhau: Cao thô nạp trên đầu cột, giải ly với dung môi có độ phân cực tăng theo kiểu bậc thang, sau khi đuổi dung môi, thu được những loại cao chiết có độ phân cực khác nhau.

Kỹ thuật này cho kết quả tương tự như kỹ thuật chiết lỏng-lỏng, sử dụng một bình lóng, nhưng ưu điểm là tránh không làm dung dịch chiết bị nhũ hóa do lắc nhiều lần.

• Để cô lập *một mẫu hợp chất thiên nhiên cần khảo sát* ra khỏi cao thô ban đầu, hoặc ở giai đoạn cuối muốn tinh chế mẫu hợp chất: để làm sạch mẫu cần khảo sát thì pha tĩnh nạp trong cột sắc ký có thể giữ lại chất tan (solute) cần thiết và cho đi qua khỏi cột những chất cản trở hoặc ngược lại,

pha tĩnh nạp trong cột có thể cho chất cần khảo sát đi qua, ra khỏi ống, còn các chất cản trở thì bị giữ lại trong cột.

** Nguyên liệu*

• ***Pha tĩnh***: Kỹ thuật chiết pha rắn sử dụng ba loại hấp thu: loại phân cực, loại không phân cực và loại trao đổi ion. Các hạt hấp thu thường có đường kính 40 μm. Khả năng lưu giữ chất của chất hấp thu vào khoảng 5% trọng lượng chất hấp thu.

Bảng 6 trình bày một số thông tin về các loại chất hấp thu sử dụng trong kỹ thuật chiết pha rắn.

Mỗi loại chất hấp thu do có khả năng tương tác khác nhau đối với các chất hữu cơ vì thế mà chất hấp thu có thể hoặc giữ chất ở lại trong cột hoặc thả cho chất đi qua khỏi cột. Nếu biết trước được cấu trúc hoá học, các nhóm chức hoá học của hợp chất cần khảo sát, có thể chọn được chất hấp thu phù hợp để thực nghiệm.

Có thể tự nạp chất hấp thu vào một cột bằng thủy tinh, giống như nạp chất hấp thu vào cột sắc ký. Trong thương mại, các nhà sản xuất có bán sẵn các ống để có thể sử dụng ngay. Chất hấp thu được nhồi sẵn trong những ống hình trụ làm bằng polypropylen. Có nhiều cỡ ống khác nhau, mỗi ống được nhồi chất hấp thu từ 50 mg đến 10 gam (Hình 12).

• ***Chuẩn bị mẫu nguyên liệu cần chiết***

Phải chuẩn bị nguyên liệu cần chiết tuỳ thuộc vào sự tương hợp (compatibility) giữa chất hấp thu trong cột nhồi và dung môi sẽ giải ly cột. Thí dụ nguyên liệu cần chiết là một dung dịch metanol-nước, muốn thực hiện với cột chiết có nạp chất hấp thu pha thường (silica gel, diol, alumina...): phải đuổi cho hết nước ra khỏi nguyên liệu, bằng cách cô quay chân không, bởi vì nước không tương thích được với chất hấp thu pha thường. Tiếp theo, nguyên liệu cần chiết này được hòa tan vào một dung môi kém phân cực, thí dụ như etyl acetat, toluen, hexan... (các loại dung môi này hoà tan có mức độ đối với nguyên liệu cần chiết).

Bảng 6: Một số thông tin về các loại chất hấp thu sử dụng trong kỹ thuật chiết pha rắn.

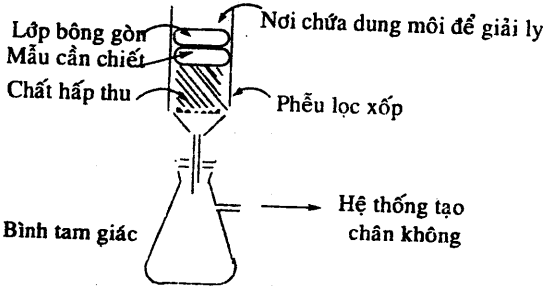
Loại	Cấu trúc hóa học chất hấp thu	Tính chất của chất hấp thu	Cấu trúc của chất hấp thu	Môi trường chất hấp thu	Dung môi tiêu biểu
Chất hấp thu không phân cực	C18-octadecyl	Rất không phân cực	Các nhóm có tính kỵ nước. Các nhân thơm. Dây alkyl	Dung dịch nước: Nước. Acetonitril. Dung dịch đệm. Dung dịch huyết tương	Metanol Etyl acetat. Cloroform. Metanol có tính acid. Hexan
	C8-octyl	Không phân cực vừa phải			
	C2-etyl	Không phân cực yếu			
	CH-cyclohexyl	Không phân cực yếu			
	PH-phenyl	Không phân cực vừa phải			
	CN-cuối dây có cyanopropyl	Không phân cực vừa phải/ phân cực			
Chất hấp thu phân cực	CN-cyanopropyl	Không phân cực vừa phải/ phân cực	Nhóm phân cực: Hydroxy. Amin. Dị nguyên tử (O,N,S)	Không phân cực. Hexan Dầu Lipid	Metanol. Isopropanol. Aceton
	2 OH-diol	Phân cực			
	Si-silica	Phân cực			
	NH_2-aminopropyl	Phân cực			
Chất trao đổi cation	SCX-acid benzensulfonic	Cation mạnh	Cation: Amin. Pyrimidin	Dung dịch nước: Nước. Dung dịch đệm tính acid	Dung dịch đệm tính kiềm Dung dịch đệm nồng độ muối lớn
	PRS-acid propylsulfonic	Cation mạnh			
	CBA-acid carboxylic	Cation yếu			
Chất trao đổi anion	SAX-amin tứ cấp	Anion mạnh	Anion: Acid carboxylic. Acid sulfonic. Phosphat	Dung dịch nước: Nước. Dung dịch đệm tính kiềm	Dung dịch đệm tính acid. Dung dịch đệm nồng độ muối lớn
	PSA-amin nhất và nhị cấp	Anion yếu/phân cực			
	NH_2-aminopropyl	Anion yếu/phân cực			
	DEA-dietylaminopropyl	Anion yếu/phân cực			

Ngược lại, nếu nguyên liệu cần chiết là một dung dịch toluen, muốn thực hiện với cột chiết có nạp chất hấp thu pha đảo (C8, C18...): nguyên liệu được cô quay chân không đến khô. Tiếp theo, nguyên liệu khô được hòa tan

vào một lượng tối thiểu dung môi, loại dung môi tương thích với dung môi sẽ sử dụng để giải ly cột. Tuy nhiên, kể cả khi đã tìm được dung môi tương thích với chất hấp thu trong cột, cũng cần lưu ý đến tính phân cực của các hợp chất có trong nguyên liệu cần chiết. Trong nguyên liệu đầu vừa có chất mong muốn cô lập và vừa có nhiều chất tạp khác, muốn loại bỏ, vậy cần phải chọn được dung môi giải ly phù hợp, để sao cho hoặc là chất muốn cô lập được giữ lại trong cột, còn những chất tạp khác sẽ chạy ra khỏi cột, hoặc là tiến trình xảy ra ngược lại: chất muốn cô lập chạy ra khỏi cột, còn chất tạp khác bị giữ lại trong cột.

✱ ***Dụng cụ*** (Hình 13)

Có thể ráp hệ thống với những dụng cụ có sẵn trong phòng thí nghiệm, gồm một cột (cột là phễu lọc xốp bằng thủy tinh, phễu phải có lỗ xốp cỡ số 3 để giúp cho dung môi chảy ngang qua phễu dễ dàng). Bình tam giác. Hệ thống tạo áp suất bằng vòi nước. Hệ thống chỉ hoạt động với một áp suất vừa phải, khoảng 20-70 mmHg, sử dụng áp suất mạnh sẽ làm gảy cột hấp thu.



Hình 13: Hệ thống chiết pha rắn

✱ ***Thực hành***

• ***Nạp chất hấp thu vào cột***: Gắn phễu lọc xốp vào bình tam giác và cho hệ thống tạo áp suất kém hoạt động. Múc từng lượng nhỏ chất hấp thu khô cho vào phễu, dùng nút thủy tinh có đáy bằng để ***nén nhẹ*** và đều. Vừa nạp chất hấp thu vào phễu, vừa gõ nhẹ ngoài thành phễu để chất hấp thu tạo thành một khối đồng nhất, chặt chẽ, có bề mặt bằng phẳng. Chiều cao của

chất hấp thu sau khi nạp cột ***chỉ được cao khoảng 5cm***. Nếu cần chiết tách một lượng nguyên liệu đầu nhiều hơn thì sử dụng phễu có đường kính lớn hơn (nghĩa là gia tăng theo đường kính chớ không tăng theo chiều cao).

Sau khi nạp cột xong, đặt một lớp bông gòn dầy lên trên bề mặt chất hấp thu để tránh cho dung môi sau này có thể làm hư hại bề mặt chất hấp thu.

• ***Rửa và cân bằng cột:*** Sau khi nạp cột, cột này cần được rửa với dung môi. Cột nhồi pha đảo được rửa với 6-10 lần thể tích cột với acetonitril hoặc metanol. Cột nhồi chất trao đổi ion được rửa với 6-10 lần thể tích với metanol. Cột pha thường không cần giai đoạn rửa này. Thao tác bằng cách rót dung môi lên trên đầu cột rồi hút hoặc nén cho dung môi chảy ngang qua cột.

Tiếp theo cột cần được cân bằng với 6-10 lần thể tích với loại dung môi sẽ sử dụng để giải ly cột. Vận tốc dung môi để cân bằng cột không quan trọng, có thể 5-10 mL/phút. Một khi cột đã được cân bằng rồi, tránh đừng để cột bị khô hoàn toàn trước khi nạp mẫu nguyên liệu cần chiết lên mặt cột.

• ***Nạp mẫu lên cột:*** Đặt mẫu lên bề mặt cột sao cho tạo thành một lớp mỏng trên bề mặt cột. Lượng mẫu nạp lên đầu cột phải ít hơn khả năng của chất hấp thu. Khả năng này tuỳ thuộc vào nhiều yếu tố: tổng nồng độ của tất cả các chất có trong nguyên liệu, sự phân cực của mẫu và dung môi, tính ái lực của hợp chất khảo sát đối với chất hấp thu.

Khi thấy hợp chất cần cô lập (là một trong các chất có trong nguyên liệu) được giữ lại quá ít trong cột, nghĩa là sự phân cực giữa mẫu khảo sát, dung môi giải ly, chất hấp thu chưa phù hợp.

Thí dụ một dung dịch 50% metanol nước chiết lên men sau khi cho đi ngang qua cột nhồi chất hấp thu C8 và chất cần cô lập đã không bị cột giữ lại đủ thì cần phải làm giảm nồng độ metanol trong dung dịch nguyên liệu bằng cách hoặc là pha loãng dung dịch với nước hoặc cô quay để đuổi bớt metanol.

• ***Rửa cột:*** Sau khi nạp mẫu cần chiết lên đầu cột xong, cần rửa cột với hai lần thể tích loại dung môi lúc nạp mẫu. Cần kiểm tra dung dịch rửa cột hứng được để đề phòng có một ít sản phẩm mong muốn chưa bám chặt vào chất hấp thu trong cột và rớt ra khỏi cột.

• *Giải ly mẫu ra khỏi cột*

Lựa chọn độ phân cực của dung môi giải ly hợp chất ra khỏi cột tùy vào mục đích cần cô lập hợp chất như thế nào.

- Nếu muốn thu được tất cả sản phẩm có trong nguyên liệu thành một dung dịch đậm đặc với lượng thể tích nhỏ (nguyên liệu hiện diện với lượng thể tích lớn, nồng độ loãng): Sử dụng ngay lập tức một loại dung môi mạnh, thí dụ với cột nhồi pha đảo thì giải ly với metanol, isopropanol, tetrahydrofuran...

- Muốn chia nguyên liệu ban đầu thành nhiều phân đoạn có tính phân cực khác nhau: giải ly với dung môi có độ phân cực tăng theo kiểu bậc thang. Thí dụ với cột nhồi pha đảo C-18 có thể được giải ly như sau:

⁂ Có thể là 100% nước; metanol-nước (1:3 v/v); metanol-nước (1:1 v/v); metanol-nước (3:1 v/v); 100% metanol; 100% diclorometan.

⁂ Có thể là 100% nước; nước -acetonitril (8:2 v/v); nước -acetonitril (6:4 v/v); nước -acetonitril (4:6 v/v); nước -acetonitril (2:8 v/v); 100% acetonitril, 100% metanol.

- Với hợp chất có tính base, với mỗi loại dung môi nói trên, cho thêm (tính bằng thể tích) 0,1% acid trifluoroacetic (viết tắt là TFA) vào sẽ giúp việc tách chất tốt hơn.

2.3. Các chất gây trở ngại cho việc chiết - chất giả tạo (Artifact)

Khi chiết các hợp chất thiên nhiên từ cây cỏ với các kỹ thuật nêu trên, người ta mong muốn chiết các hợp chất hữu cơ cần quan tâm, bên cạnh đó cũng chiết luôn các hợp chất hữu cơ không mong muốn khác có sẵn trong cây. Các hợp chất này thường làm cản trở quá trình tinh chế hợp chất chính cần khảo sát.

2.3.1. Các chất bôi trơn (grease)

Trong quá trình thực nghiệm, thường sử dụng chất bôi trơn silicon để làm trơn các nút mài của máy cô quay, các cổ bình cầu làm bằng thủy tinh. Khi rót dung môi vào bình, dung môi chảy ngang qua cổ bình nên cũng hòa

tan luôn chất bôi trơn silicon làm lôi luôn silicon vào chung trong dung dịch cần phải cô quay khiến hợp chất cần khảo sát bị nhiễm bẩn.

Với loại chất bôi trơn là các alcan mạch dài, nếu có lẫn chất này vào chất khảo sát thì sẽ thấy trên phổ khối đồ của chất khảo sát các tín hiệu của chất bôi trơn: có các mũi với cường độ giảm dần đều và giá trị *m/z* của các mảnh này chênh lệch nhau 14 đơn vị carbon.

Nếu chất bôi trơn là silicon sẽ thấy trên phổ khối có các mảnh có *m/z* 429, 355, 281, 207 và 133.

Muốn tránh gặp trường hợp này thì không nên lạm dụng chất bôi trơn, chỉ sử dụng với ***số lượng tối thiểu*** vừa đủ để làm trơn.

2.3.2. Các chất béo (lipid)

Các chất béo trong cây cỏ thường là các triglycerid, alcan mạch carbon dài, alcol béo, ester béo, acid béo.... Các chất béo hòa tan tốt trong dung môi không phân cực, nhưng chúng cũng hoà tan được trong các dung môi phân cực, vì thế khi sử dụng etanol để chiết các hợp chất có trong cây cũng sẽ chiết luôn các chất béo. Các chất béo được nhận biết khi khảo sát bằng sắc ký lớp mỏng và hiện hình bằng hơi iod, cho hiện trên bản mỏng vết có màu nâu.

Muốn loại bỏ các chất béo, có thể sử dụng một trong những cách sau.

✱ ***Sử dụng các kỹ thuật chiết rắn - lỏng*** đã trình bày ở trên: Nguyên liệu bột cây trước tiên được chiết kiệt bằng eter dầu hỏa hoặc hexan. Các chất béo trong cây sẽ hòa tan hết vào dung môi này. Lọc lấy dung môi, phơi khô bột cây, tiếp theo sử dụng một loại dung môi khác, có tính phân cực hơn để chiết lấy hợp chất cần khảo sát.

Trong trường hợp do kinh phí hạn chế, chiết bột cây bằng etanol. Cao etanol này sẽ được chiết bằng eter dầu hỏa để loại bỏ béo trước khi thực hiện việc chiết bằng các loại dung môi khác.

✱ ***Sử dụng kỹ thuật chiết pha rắn với cột có nhồi chất hấp thu pha đảo***: giải ly cột bằng metanol: các chất phân cực cần khảo sát sẽ ra khỏi cột, trong khi đó các chất béo vẫn còn bị giữ lại trong cột (sẽ bị đuổi ra khỏi cột sau này).

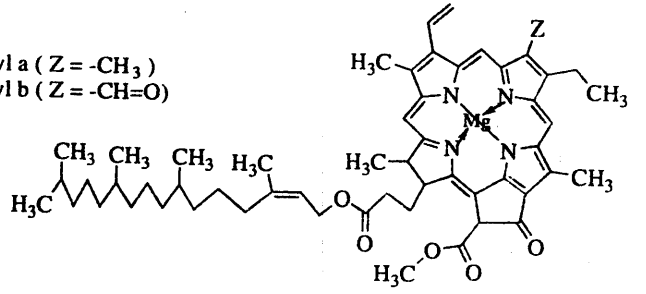
✱ ***Sử dụng sắc ký cột***: Cột sắc ký loại cổ điển hoặc loại sắc ký nhanh-cột khô được giải ly trước tiên bằng eter dầu hỏa hoặc hexan để loại bỏ các hợp chất béo không phân cực ra khỏi cột.

✱ ***Sử dụng nhiệt độ lạnh***: Nếu dung dịch chiết bột cây có chứa các chất béo lẫn chung với các sterol, để yên dung dịch chiết này một thời gian trong tủ lạnh ở 0- 5°C. Thời gian lâu hay mau tùy vào nồng độ của sterol và chất béo có trong dung dịch. Mỗi ngày lấy bình chứa ra để quan sát, nếu có, chất béo sẽ đóng váng nổi lên trên mặt thoáng của dung dịch, dùng muỗng vớt ra (Giống như để nồi thịt kho vào trong tủ lạnh).

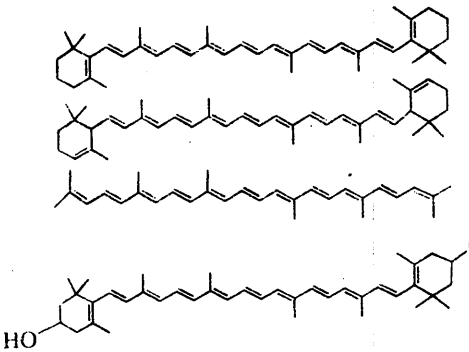
2.3.3. Các chất màu (pigment)

Khi nghiền các tế bào thực vật, chúng sẽ phóng thích hai loại sắc tố là clorophyl màu xanh lá cây và caroten màu vàng. Có hai loại clorophyl a và b cùng hiện diện trong thực vật có màu xanh lục với tỉ lệ a: b (3:1). Clorophyl có cấu trúc giống như một heme với ion Mg^{2+} ở tâm, với cấu trúc như thế nó dễ bị hư hại khi gặp môi trường acid hoặc bị đun nóng do ion Mg sẽ đi ra khỏi cấu trúc (Điều này dễ nhận biết khi nấu canh: rau lúc còn tươi sống có màu xanh, khi bị nấu chín biến thành màu nâu).

Clorophyl a (Z = $-CH_3$)
Clorophyl b (Z = -CH=O)



Các caroten là tetraterpen, là hydrocarbon bất bão hòa, tạo nên bởi tám đơn vị isopren, hợp chất tạo nên màu vàng hoặc màu cam cho các loại quả như: cam, gấc, cà rốt, cà chua, ớt....



β– Caroten

α - Caroten

γ – Caroten

Xantophyl (còn gọi là zeaxanthin)

Các caroten và clorophyl do mang nhiều nối đôi liên hợp nên hấp thu ánh sáng thấy được. Các caroten hấp thu các ánh sáng có bước sóng ở 450-550 nm, vùng của ánh sáng xanh dương vì thế phần ánh sáng còn lại phản chiếu làm mắt thấy được màu cam; còn clorophyl hấp thu ánh sáng thấy được ở khoảng 650 nm, là vùng của ánh sáng màu cam vì thế phần ánh sáng phản chiếu làm cho mắt nhìn được màu xanh lục.

Các hợp chất màu này thường hay hiện diện trong cao chiết ở các nồng độ cao, thấp khác nhau tùy vào bộ phận nào của cây được chiết. Muốn loại các hợp chất này không dễ, tuy nhiên có thể loại bằng một số phương pháp như sau.

✱ ***Sử dụng cát***: sắc ký cột với chất hấp thu là cát để loại các chất màu trong cao chiết

Cột sắc ký dài 30 cm, đường kính cột 1,5 cm. Bốn phần năm (4/5) cây cột được nhồi bằng cát mịn tinh chế (cát Fontainebleau). 5 gam lá cây xanh được nghiền nhuyễn trong cối với 10 ml etanol và 30 ml eter dầu hoả loại 60°C, lọc lấy dung dịch chiết, rửa dung dịch này ba lần, mỗi lần với 20 ml nước cất. Tách lấy pha hữu cơ, làm khan nước bằng Na_2SO_4, cô quay còn khoảng 1 ml. Đặt dung dịch này lên đầu cột sắc ký và giải ly cột bằng 200 ml hỗn hợp dung môi dietyl eter: eter dầu hỏa, tỉ lệ 4:6 (v/v). Quan sát màu của dung dịch giải ly để biết khi nào thì màu ra khỏi cột: caroten ra trước (dung dịch màu vàng), kế đến là xantophyl (màu cam), clorophyl a (màu xanh dương-lục) và clorophyl b (màu vàng-lục.)

✱ ***Sử dụng than hoạt tính***: Có thể tẩy màu của dung dịch chiết bằng cách cho dung dịch này chảy ngang qua một cột tương đối ngắn có chứa than hoạt tính hoặc sử dụng một becher chứa dung dịch chiết, cho than hoạt tính vào (nếu đun nóng sẽ hiệu quả hơn), để yên trong một đêm rồi lọc bỏ bột than.

Tuy nhiên, sử dụng than hoạt tính có nhược điểm là có thể hấp thu luôn các hợp chất cần khảo sát thí dụ có thể hấp thu các alcaloid như morphin, strychnin, quinin... (vì vậy bột than được sử dụng như thuốc giải độc trong trường hợp ngộ độc alcaloid).

✱ ***Sử dụng celit***: Celit là tên thương mại của đất sét diatomit được sử dụng làm chất trợ lọc, với thành phần hóa học gồm khoảng 90% là SiO_2 cùng một số lượng nhỏ CaO, Al_2O_3 và Fe_2O_3. Loại màu của dung dịch chiết bằng cách cho dung dịch này chảy ngang qua một phễu lọc có phủ một lớp celit với chiều dầy khoảng 2-3 cm.

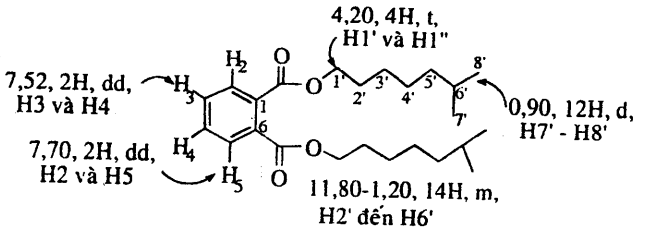
✱ ***Sử dụng dung dịch 2-5% acetat chì (II):*** acetat chì nhị là $Pb(OAc)_2$ là tác chất tạo sự kết tủa, thường được sử dụng để tạo tủa các loại hợp chất acid béo, clorophyl, các hợp chất có màu khác.

Một dung dịch chiết bằng etanol-nước có tính nhầy nhựa, rót dung dịch acetat chì vào (đun ấm nếu thấy cần) sẽ thấy có tủa trắng; để yên một đêm cho tủa lắng xuống đáy bình chứa và hôm sau lọc dung dịch ngang qua một phễu buchner có chứa chất trợ lọc celit, lọc bằng áp suất. Lưu ý nếu thấy dòng chảy của dung dịch qua lọc bị chậm lại thì sử dụng một spatule cạo nhẹ lớp mặt celit để phơi ra lớp celit mới, giúp cho dòng chảy tốt hơn.

Phương pháp này cũng có nhược điểm là sẽ tạo tủa với một vài loại hợp chất hữu cơ khác.

2.3.4. Các chất làm dẻo (plasticizer)

Các dung môi thường lẫn tạp chất làm dẻo do dung môi được chứa trong các thùng làm bằng nhựa dẻo. Loại chất làm dẻo thường gặp nhất là diisooctyl ptalat, đó là loại dầu màu vàng nhạt, có hoạt tính ức chế tế bào P-388 là tế bào ung thư hạch bạch huyết của chuột (murine lymphocytic leukemia cell).



Phổ ^{1}H-NMR (δppm, $CDCl_3$) của diisooctyl phtalat.

Các số đo hóa lý của hợp chất diisooctyl ptalat được trình bày như sau. Khi sắc ký lớp mỏng giải ly bằng hệ dung môi eter dầu hỏa: etyl acetat (19:1), hợp chất này cho vết màu hồng-tím với Rf = 0,4 khi bản được phun xịt bằng acid sulfuric đậm đặc hoặc bằng hỗn hợp acid sulfuric đậm đặc: acid acetic (4:1) rồi sấy nóng ở 110°C trong năm phút.

Muốn loại bỏ, chỉ có thể bằng chưng cất lại dung môi trước khi sử dụng hoặc lọc dung dịch chiết ngang qua một cột nhồi bằng alumina.

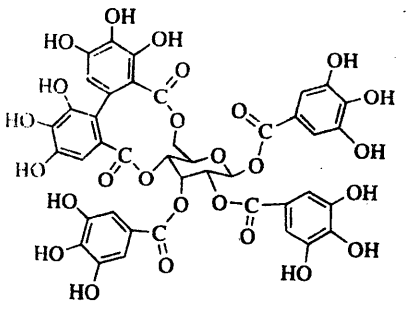
2.3.5. Chất tanin (tannin)

Cây cỏ nhất là vỏ quả măng cụt, lá trà, lá ổi... thường chứa tanin ở hàm lượng cao. Tanin thực vật là hợp chất polyphenol, loại hợp chất rất phân cực nên muốn chiết chúng ra khỏi cây cỏ phải sử dụng dung môi phân cực.

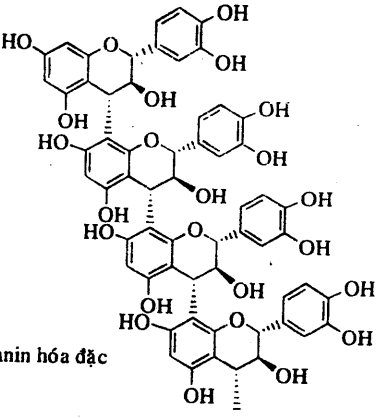
Dung dịch nước chiết hoặc dung dịch chiết bằng dung môi hữu cơ có chứa tanin có khả năng ức chế các enzym như topoisomerase 1 và 2 (viết tắt là T-1 và T-2), các enzym siêu vi sao chép ngược (viral reverse transcriptase). Do cấu trúc đặc trưng của tanin nên khi có sự hiện diện của tanin trong cao chiết, nó có thể dẫn đến kết quả dương tính-giả tạo (false-positive result), làm sai lệch kết quả một số thử nghiệm hoạt tính sinh học vì tanin tạo các cầu nối hydrogen liên phân tử với protein, làm kết tủa protein.

Tanin được phân thành hai nhóm lớn tùy theo cấu trúc hóa học của nó. "Tanin thủy giải được" (hydrolyzable tannin) hoặc proanthocyanin còn được gọi là "tanin hóa đặc" (condensed tannin) là tùy theo việc tanin đó có hoặc không bị thủy giải bởi men hoặc bởi môi trường acid/ base. Tanin thủy giải được là polyester khi bị thủy phân cho ra phần aglycon là polyphenol gồm

acid galic hoặc acid hexahydroxydiphenic. Tanin hóa đặc là sự ngưng tụ của những đơn vị flavan.



Tanin thủy giải được



Tanin hóa đặc

Xác định sự hiện diện của tanin bằng dung dịch 5% $FeCl_3$ trong nước hoặc trong etanol, sẽ cho tủa màu nâu.

Muốn loại bỏ tanin ra khỏi cao chiết có thể sử dụng một số biện pháp sau.

✱ ***Sử dụng dung dịch gelatin mặn*** (là dung dịch nước gồm 5% NaCl (w/v) và 0,5% (w/v) gelatin). Rót từ từ dung dịch gelatin vào dung dịch chiết, khuấy nhẹ và để yên qua đêm. Tanin trong dịch chiết nước bị kết tủa bởi dung dịch gelatin mặn. Lọc bỏ tủa.

✱ ***Sử dụng dung dịch nước NaOH 1%:*** Với dung dịch chiết là dung môi hữu cơ không tan trong nước: sử dụng bình lóng để lắc dung dịch chiết này với dung dịch nước NaOH 1%. Các polyphenol (tanin) biến thành phenolat tan vào pha nước, tách riêng. Pha hữu cơ còn lại không còn tanin. Phương pháp này có thể loại luôn các hợp chất là dẫn xuất của phenol như flavonoid....

✱ ***Sử dụng dung dịch nước NaCl 1%:*** Với dung dịch chiết là cloroform: sử dụng bình lóng để lắc dung dịch chiết này với dung dịch nước NaCl 1%. Tanin phân bố vào pha nước ở lớp trên, pha cloroform ở lớp dưới không còn tanin. Tách riêng pha cloroform, làm khan nước.

* ***Sử dụng protein*:** Tương tự, tanin cũng bị tủa bởi protein. Có thể lấy phần tròng trắng trứng gà-vịt (là albumin, một loại protein) rót vào dung dịch nước chiết và khuấy nhẹ, tanin sẽ bị tủa, lọc bỏ tủa.

* ***Sử dụng sắc ký cột với chất hấp thu là resin polyamid; silica gel; polyvinyl pyrrolidone* (viết tắt là PVP):** cho dung dịch chiết chảy ngang qua một cột nhỏ có chứa một trong những chất hấp thu nêu trên, do các chất hấp thu tạo cầu nối hydrogen với các nhóm polyhydroxy của tanin khiến cho tanin bị giữ lại trong cột. Hoặc sử dụng một becher chứa dung dịch chiết, cho chất hấp thu nói trên vào, khuấy đều, để yên trong một đêm, rồi lọc bỏ.

Phương pháp này cũng có nhược điểm là resin polyamid; silica gel; polyvinyl pyrrolidone cũng có thể hấp thu một vài loại hợp chất hữu cơ phân cực khác.

* ***Sử dụng sắc ký cột với chất hấp thu là nhựa trao đổi ion DE 52*:** Nhựa trao đổi ion với phần nền là cellulose có gắn nhóm chức dietylaminoetyl, sẽ gắn tốt các tanin mà không giữ các hợp chất khác không phải là polyphenol.

2.3.6. Kim loại nặng thuận từ (paramagnetic heavy metal)

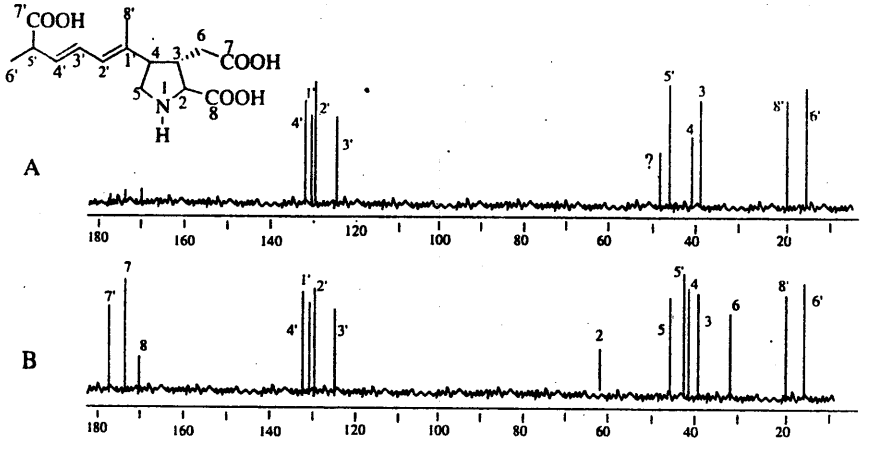
Khi cô lập được những hợp chất có tính ái dầu, người ta không gặp trường hợp sẽ trình bày sau đây, nhưng khi cô lập những hợp chất có tính ái nước (water-soluble compounds), các hợp chất này thường có chứa một ít tạp bẩn là những kim loại nặng thuận từ. Các kim loại này có thể có hoặc từ nguồn nguyên liệu chiết ban đầu, hoặc từ các dụng cụ trong phòng thí nghiệm, các tác chất sử dụng trong việc cô lập hợp chất ....

Trong tất cả quá trình cô lập hợp chất đều có sử dụng các hệ thống cung cấp dung môi. Các hệ thống như bơm, các ống dẫn, kim chích... đều được làm bằng thép không rỉ (SUS 13~32), các dụng cụ này sẽ phóng thích Ni và Fe khi trong quá trình làm việc có sử dụng dung dịch đệm. Sự lẫn tạp bẩn của mẫu chất tuy chỉ ở lượng rất nhỏ, cũng đủ gây nên các rắc rối trong việc ghi phổ NMR. Sự lẫn bẩn cũng có thể từ trên bề mặt của dụng cụ làm bằng thủy tinh, sự lẫn bẩn càng trầm trọng khi trong quá trình tinh chế sản

phẩm mà trước đó phải cô đặc một lượng lớn dung dịch nước acid để cô lập được vài microgam hợp chất.

Hình 14A cho thấy phổ ^{13}C-NMR của chất acid domoic, khi vừa thu được từ sắc ký cột, giải ly với hệ dung môi có chứa 0,1% acid acetic. Phổ đồ A so với phổ B cho thấy có nhiều tín hiệu cộng hưởng bị biến mất hoặc xụp đổ (collapsed) do bị tạo phức bởi kim loại. Khi xử lý mẫu với Chelex 100, phổ B cho thấy đủ các tín hiệu của hợp chất.

Các chuyên gia về cô lập các hợp chất ái nước đề nghị ở giai đoạn cuối cùng của việc tinh chế hợp chất, cần cho dung dịch mẫu đi ngang qua một cột pipet Pasteur nhỏ (0,5 x 1,5 cm, giải ly bằng 0,1 N acid acetic), có chứa Chelex 100 (sản phẩm của hãng Bio-Rad) hoặc Bio-gel P-2, hợp chất sẽ tinh khiết để ghi phổ NMR.



Hình 14: Phổ ^{13}C-NMR của acid domoic

Phổ A là mẫu chất không có xử lý với Chelex 100 và phổ B là mẫu sau khi đã xử lý với Chelex 100. Trong phổ A có nhiều tín hiệu cộng hưởng bị mất và có sự thay đổi độ dịch chuyển hóa học so với phổ B.

2.3.7. Chất giả tạo (artifact)

Mỗi giai đoạn của quá trình chiết, cô lập các hợp chất tự nhiên, đều có khả năng tạo nên những hợp chất giả tạo, là những hợp chất không phải thực sự hiện diện trong cây cỏ (nguyên thủy trong cây, hợp chất này hiện diện ở dạng khác). Muốn tránh gặp trường hợp như thế, cần phải tiến hành các thí nghiệm trong các điều kiện êm dịu nhất nếu được, để tránh xảy ra các phản ứng phụ.

* Trong giai đoạn làm cô đặc dung dịch chiết, sự hiện diện của các muối vô cơ, các vết acid có thể là tác nhân làm xúc tác cho một số phản ứng, thí dụ vết HCl có thể gây ra sự phân hủy, sự khử nước, sự đồng phân hóa cho vài hợp chất hữu cơ.

* Một vài dung môi như aceton, metanol, etylen glycol, dimetylformamid có thể tạo nên những dẫn xuất của chúng, thí dụ aceton có thể tạo ra dẫn xuất acetonid nếu hợp chất chiết có chứa nhóm *cis*-1,2-diol hiện diện trong môi trường acid.

Dung môi metanol có thể đưa đến chất giả tạo. Khi chiết nóng cây *Euchresta japonica* với dung môi methanol, tác giả đã cô lập sản phẩm ester metyl của acid 12-cystisineacetic, hợp chất này được cho rằng là sản phẩm ester hóa của hợp chất acid 12-cystisineacetic.

Metanol và cloroform thường chứa tạp chất là di(2-etylhexyl) ptalat và chất này thường bị nhiều tác giả nhầm lẫn rằng là hợp chất tự nhiên có chứa trong cây cỏ đang khảo sát, dù rằng hợp chất này có một số hoạt tính sinh học.

* Các chất hấp thu sử dụng trong phương pháp sắc ký cũng có thể góp phần hình thành nên chất giả tạo. Chất hấp thu alumina có thể gây nên phản ứng aldol hóa, chuyển vị, khử nước (dehydration) hoặc cộng nước (hydration). Chất hấp thu silica gel có thể là tác nhân làm xúc tác một số phản ứng như oxid hóa, chuyển vị, khử nhóm metyl gắn trên nitơ hoặc oxygen (*N*- and *O*-demethylation).

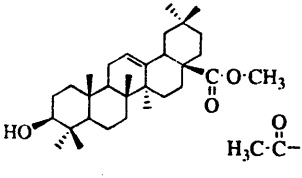
* Sử dụng giấy lọc: hợp chất triacontanol CH_3-$(CH_2)_{28}$-CH_2OH có hoạt tính kích thích sự tăng trưởng thực vật, thường là chất tạp bẩn trong một

số loại giấy lọc.

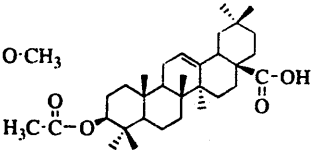
* Quá trình xử lý để loại bỏ chất béo trong cao chiết:

Đôi khi do cao chiết có chứa nhiều chất béo làm cản trở quá trình cô lập các hợp chất, người ta thường hay thực hiện sự xà phòng hóa bằng cách đun cao chiết trong dung dịch KOH/etanol trong vài giờ, tiếp theo cho dung dịch này vào một lượng nhiều nước và chiết lỏng–lỏng dung dịch nước này với cloroform. Các hợp chất hữu cơ sẽ tan vào pha cloroform, còn các muối của acid béo tan trong pha nước, được loại riêng.

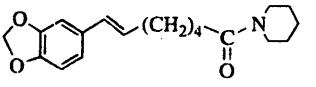
Nếu cao chiết ban đầu có chứa các hợp chất ở dạng ester hoặc amid, quá trình thao tác như thế có thể cắt đứt một số nối, khiến cho việc cô lập được hợp chất có cấu trúc hoá học không đúng như nguyên thủy hiện diện trong cây. Thí dụ nếu các hợp chất sau đây hiện diện trong cao và cao bị xà phòng hóa thì các nối ester, amid sẽ bị thủy giải trong môi trường kiềm.



Metyl oleanolat



Acid 3-β-acetoxyoleanolic



Piperolein

2.4. Một số thủ thuật khi cô lập hợp chất hữu cơ

2.4.1. Làm khô mẫu chất

Sau khi làm chiết mẫu cây bằng dung môi, lọc, thu hồi dung môi có được cao. Cao chiết này cần được sấy khô vì các lý do sau:

- Các hợp chất ở trong cao sẽ ổn định bền nếu chúng hiện diện ở trạng thái khô hơn là trạng thái lỏng.

- Để tính đúng thu suất của cao chiết so với lượng cây khô ban đầu (ghi trong báo cáo, để khi cần có thể lặp lại thí nghiệm).

- Để tiếp tục tinh chế cao bằng sắc ký cột: biết trọng lượng cao để lấy được lượng silica gel cần thiết cho sắc ký cột.

- Nếu mẫu là hợp chất tinh khiết muốn đo các số liệu phổ thì mẫu cần được sấy khô, nếu còn lẫn vết nước, trên phổ đồ xuất hiện tín hiệu của nước (thấy rõ nhất trên phổ IR, NMR) gây khó khăn trong việc giải đoán cấu trúc.

Các phương pháp làm khô mẫu

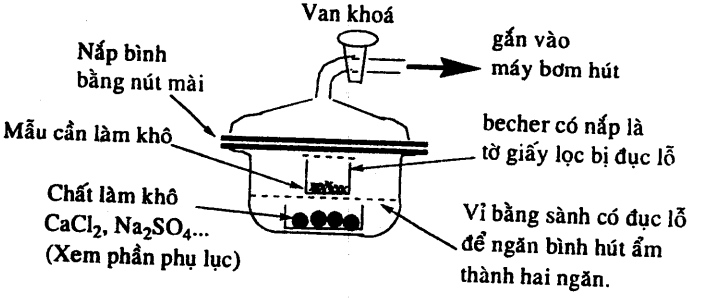
✳ ***Sấy khô bằng khí trơ trong máy cô quay chân không***: Khi cô quay chân không, đến lúc mẫu đã khô hoàn toàn, cho một luồng khí trơ thí dụ như khí nitơ đi vào máy này, đi nhẹ nhẹ từ đầu trên của máy cô quay (tại đầu trên của máy, chỗ đóng - mở áp suất để tạo chân không cho máy, có một ống để châm dung dịch vào bình cô quay mà không cần tắt ngưng máy; cho khí vào bằng ngõ này).

Nếu không có khí nitơ, có thể để mẫu lâu hơn trong máy cô quay vẫn hoạt động.

✳ ***Sấy khô nhờ bình hút ẩm***: mẫu cần làm khô được đặt trong một becher, miệng của becher được đậy bằng một tờ giấy lọc, cột chặt nhờ cọng thun; dùng kim nhọn để đụt một số lỗ nhỏ trên tờ giấy lọc. Cần phải cột chặt tờ giấy lọc nếu không, mẫu trong becher bị hút văng tung toé ra khỏi becher do áp suất chân không trong bình. Đặt becher vào bình hút ẩm, dưới đáy bình có chén sành để chứa chất hút ẩm, thí dụ như KOH, NaOH rắn, silica gel, P_2O_5, $CaCl_2$ khan ... Đậy nắp bình, nắp cần được thoa đều bằng chất bôi trơn silicon để giữ bình được kín. Sử dụng một ống cao su để nối vòi ra của bình vào một máy bơm hút. Mở van khoá ở vòi ra của bình, cho máy bơm hoạt động để hút không khí ra khỏi bình, đến khi trong bình là chân không. ***Cho máy bơm hút trong 30-60 phút*** tuỳ công suất máy, không cần thiết phải để máy hoạt động cả ngày, vừa vô ích lại làm hư máy. Khoá van bình hút ẩm trước, rồi tắt máy bơm sau; rút ống nối cao su ra khỏi bình, để yên một đêm. Hôm sau lại thao tác hút không khí, vài lần như thế mẫu chất trong bình sẽ khô.

Muốn việc hút ẩm đạt hiệu quả, cần lưu ý để thay mới chất hút ẩm: khi thấy tác chất vẫn còn khô ráo là được, còn nếu thấy chất có vẻ ẩm ướt cần phải thay mới. Hợp chất được xem là khô khi cân lần sau trọng lượng của mẫu không thay đổi so với lần cân trước đó (giữa hai lần cân, mẫu được sấy).

Có nhiều loại bình hút ẩm với kích cỡ lớn nhỏ khác nhau rất tiện dụng. Ngoài ra có loại bình hút ẩm nhờ chân không và có gia nhiệt.



BÌNH HÚT ẨM (BÌNH LÀM KHÔ,dessicator)

* ***Đông khô chân không*** **(lyophilization):** Kỹ thuật này áp dụng cho mẫu là dịch chiết bằng nước.

Dung dịch chiết được chứa trong một bình cầu, dung dịch này được làm đông đặc thành đá bằng cách nhúng bình cầu này vào một chậu bằng thủy tinh kích thước lớn hơn bình cầu, chậu có chứa etanol hoặc aceton và những viên đá bằng CO_2 rắn. Xoay tròn đều bình cầu để thành ngoài của bình cầu tiếp xúc với lạnh. Hỗn hợp lạnh alcol- CO_2 làm dung dịch nước bên trong bình cầu hóa rắn thành đá cục. Tiếp theo, lắp bình cầu vào máy đông khô chân không. Hệ thống máy sẽ hạ nhiệt độ xuống -80°C, ở chân không sâu, kế đó nhiệt độ được nâng dần lên. Trong quá trình nhiệt độ được nâng dần lên, nước trong bình cầu sẽ bốc hơi hết ra khỏi bình cầu. Sau khoảng 24 giờ, trong bình cầu chỉ còn chứa mẫu ở dạng khô, tơi, xốp, dễ dàng hoà tan trở lại vào nước. Dạng bột này rất dễ hút ẩm, phải được trữ trong bình kín hoặc đóng gói kín.

Kỹ thuật này thường được áp dụng trong ngành dược để có các sản phẩm khô các loại thuốc kháng sinh, thu được từ lên men vi sinh; sản phẩm được chứa trong chai thuốc khẳn kín. Kỹ thuật này cũng được sử dụng trong ngành đông dược, thí dụ có loại dược liệu chứa trong các túi kín, khi xé túi ra thấy một lá tía tô khô, lá này đã được tẩm các loại thuốc trị liệu. Thả lá tía tô khô này vào một chén nước nóng, lá sẽ hút nước trương nở thành một lá tươi nguyên như lúc mới hái, toả ra các mùi thơm để xông mũi trị bệnh... Kỹ thuật

cũng được áp dụng trong ngành thực phẩm cao cấp, trong bao mì gói có gói nêm chứa các con tôm. Khi gặp nước sôi, con tôm khô hút nước trở thành một con tôm mới luộc tươi nguyên.

Trong phòng thí nghiệm hóa học, kỹ thuật này áp dụng cho các hợp chất đại phân tử như: protein, polysacarid.

2.4.2. Sự kết tinh lại (Recrystallization)

Trong hóa học các hợp chất tự nhiên, người ta thường muốn cô lập hợp chất ở dạng tinh khiết để có thể xác định cấu trúc hóa học bằng các phương pháp hóa lý hiện đại. ***Độ tinh khiết của hợp chất cần phải > 95%***. Hợp chất càng tinh khiết, việc xác định cấu trúc càng chính xác. Trong vài trường hợp khảo sát cấu trúc hóa học bằng tia X, sản phẩm cần đạt độ tinh khiết 99,9%.

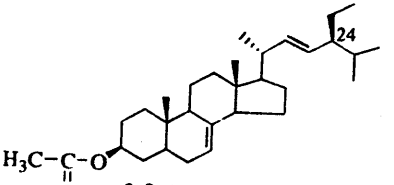
Để đạt được hợp chất có độ tinh khiết càng cao, công việc thực hiện càng khó khăn, phức tạp. Trước tiên, khi khởi đầu trên cao chiết thô để loại bỏ bớt đi một nửa những chất không cần thiết thì công việc tương đối nhẹ; kế đó, từ những phân đoạn nhỏ, muốn cô lập được hợp chất đạt độ tinh khiết 95% đã phải tốn công thực hiện sắc ký đi, sắc ký lại nhiều lần; và để nâng độ tinh khiết từ 95 lên đến 99,5% công việc càng khó khăn và dĩ nhiên càng khó khăn hơn nữa khi muốn nâng từ 99,5% lên 99,9%. Không có hợp chất nào tinh khiết 100%.

Các hợp chất cô lập được sau quá trình sắc ký cột, dù đôi khi quan sát bằng mắt thường thấy hợp chất ở dạng bột trắng, thậm chí ở dạng tinh thể không màu, dù sắc ký lớp mỏng sử dụng nhiều loại hệ dung ly khác nhau vẫn chỉ cho một vết gọn đẹp, những hợp chất này cũng chỉ đạt độ tinh khiết 90-95% mà thôi. Sở dĩ như thế là vì một tinh thể của hợp chất nếu có thể quan sát được bằng mắt thường là gồm rất nhiều phân tử của hợp chất đó kết hợp lại với nhau, trong quá trình kết hợp lại với nhau, chúng cũng gom luôn một ít các phân tử tạp bẩn từ môi trường bên ngoài và lượng này khá ít nên không thể nhìn thấy được bằng mắt thường.

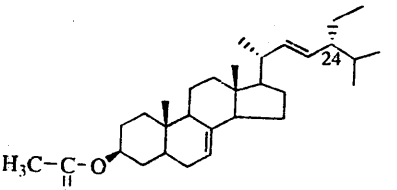
Với độ tinh khiết 90-95%, việc xác định cấu trúc hóa học bằng các phương pháp hóa lý sẽ không cho kết quả chính xác, vậy cần phải kết tinh lại hợp chất này.

Một hợp chất tinh khiết có độ tinh khiết > 95% mới có thể khảo sát bằng các phương pháp hóa lý.

Thí dụ hai hợp chất 3-β-acetoxyspinasterol và 3-β-acetoxychondrillasterol chỉ khác nhau tại cấu hình của carbon ở C-24. Hai hợp chất này có số liệu về ^{13}C-NMR giống nhau, không thể phân biệt. Tuy nhiên, vì đây là hai xuyên lập thể phân (two diastereoisomers), nên chúng có các đặc tính vật lý khác nhau (thí dụ nhiệt độ nóng chảy khá khác biệt như trình bày trong hình sau), nhờ vậy có thể tách riêng hai hợp chất này bằng kỹ thuật sắc ký cột.



3-β-Acetoxyspinasterol
m.p.= 188,5 - 189°C



3-β-Acetoxychondrillasterol
m.p.= 182 - 184°C

2.4.3. Sự kết tinh phân đoạn (Fractional crystallization)

Trong một vài trường hợp đặc biệt, người ta có thể tách riêng một hợp chất ra khỏi một hỗn hợp là nhờ vào độ hòa tan khác nhau trong một dung môi nào đó, kỹ thuật này được gọi là kết tinh phân đoạn.

Thí dụ có một hỗn hợp gồm ba hợp chất A, B và C. Giả sử có thể tìm được một dung môi hoà tan vô hạn B và C ở bất kỳ nhiệt độ nào và A chỉ hòa tan bình thường. Thực hành bằng cho mẫu hỗn hợp vào dung môi nóng, lọc nóng qua một tờ giấy lọc. Để yên cho dung môi nguội từ từ, hợp chất A sẽ kết tinh lại thành chất rắn (dĩ nhiên là có kết tinh lẫn theo nó là một ít B và C), trong khi đó lượng lớn B và C vẫn còn ở lại trong dung dịch cái. Lọc để lấy riêng tinh thể A. Thực hành việc kết tinh như thế thêm hai lần nữa bằng dung môi tinh khiết sẽ có tinh thể A tinh khiết.

Thực hiện như thế có nhược điểm là làm hao hụt sản phẩm chính, có thể khắc phục bằng cách nhập hai lần dung dịch nước cái của lần kết tinh một

và hai, cô quay để thu hồi hợp chất và thực hiện sự kết tinh lại.

2.4.4. Kết tinh nhờ nhiệt độ lạnh

Trong một vài trường hợp đặc trưng khi có một hợp chất hiện diện với hàm lượng cao trong cây cỏ khảo sát, người ta có thể thu được hợp chất ở dạng tinh thể nhờ nhiệt độ lạnh, với một vài thí dụ như sau.

a) *Gossypol thu từ nhân của hạt bông vải*: Nhân của hạt cây bông vải được chiết bằng eter dầu hỏa để loại chất béo, phần bã còn lại được chiết với dietyl eter. Dung dịch eter này được lọc, thu hồi dung môi để còn một dung dịch khá đậm đặc, thêm vào đó acid acetic băng với lượng thể tích bằng một phần ba thể tích của dung dịch eter. Toàn thể dung dịch này được chứa trong một becher đậy bằng một tờ giấy lọc; để yên trong tủ lạnh 0°C trong một ngày, sẽ có bột mịn màu vàng tươi dưới đáy becher. Đó là phức gossypol-acid acetic.

b) *Naringin thu được từ vỏ trái nho*: Chiết vỏ trái nho bằng nước nóng, lọc qua một lớp celit. Dung dịch lọc được cô cạn bớt để có một dung dịch khá đậm đặc, để yên trong tủ lạnh 0°C trong một thời gian, thu được tinh thể naringin ngậm tám phân tử nước (nhiệt độ nóng chảy 83°C). Lọc lấy tinh thể và kết tinh lại trong isopropanol (100 ml cho 8,6 g naringin) thu được tinh thể naringin ngậm hai phân tử nước (nhiệt độ nóng chảy 171°C).

c) *Piperin thu từ hạt tiêu*: Hạt tiêu đen được chiết với etanol 95%. Dịch chiết được lọc, cô đậm đặc, thêm vào dung dịch KOH 10% trong alcol nếu thấy có tủa gì thì lọc bỏ tuả đó. Dung dịch lọc được để yên trong tủ lạnh 0°C trong một ngày hoặc vài ngày tùy hàm lượng piperin trong dung dịch, sẽ có tinh thể hình kim màu vàng dưới đáy becher.

d) *Capsanthin thu từ ớt đỏ*: Ớt đỏ được chiết với dietyl eter. Dịch chiết được lọc, cô đậm đặc. Với mỗi 20 ml dung dịch này, hoà thêm 60 ml eter dầu hỏa, dung dịch được để yên trong tủ lạnh 0°C trong 24 giờ sẽ có tinh thể capsanthin.

e) Dung dịch chiết carotenoid thường có lẫn các sterol hiện diện ở số lượng khá lớn. Có thể loại bỏ các sterol này bằng cách để yên trong tủ lạnh -10°C trong một ngày sẽ có sterol kết tủa, chỉ cần lọc bỏ sterol.

3. PHÂN TÍCH SƠ BỘ HÓA –THỰC VẬT MỘT SỐ CAO CHIẾT

Từ mẫu cây thô, áp dụng các kỹ thuật chiết trình bày ở các phần trên để có được cao chiết alcol toàn phần hoặc các loại cao có tính phân cực khác nhau. Trước khi bắt đầu quá trình sắc ký cột để cô lập các hợp chất tinh khiết, người ta thường muốn biết xem cao chiết này có thể chứa những loại hợp chất thiên nhiên mà người nghiên cứu muốn cô lập (trường hợp đã có mục tiêu cụ thể để theo đuổi) hoặc có thể chứa các loại hợp chất nào (để định hướng công việc và có các biện pháp xử lý thích hợp).

Trước tiên, cần biết một số đặc điểm của cao chiết về độ hòa tan (tính ái nước, tính ái dầu), tính acid-base, điện tích của phân tử, độ bền, kích thước của phân tử....

3.1. Tìm hiểu một số đặc điểm của cao chiết

3.1.1. Tính ái nước, tính ái dầu

Muốn biết độ phân cực của một hỗn hợp nào đó, cần thao tác như sau: lấy một lượng nhỏ mẫu và làm cho mẫu thật khô (nên sử dụng lò sấy chân không để chất không bị hư hại bởi nhiệt độ), chia mẫu khô làm hai phần và thực hiện hai việc sau.

a) Hoà tan trong dung môi

Cho chất khô vào bảy ống nghiệm với số lượng bằng nhau, với mỗi ống nghiệm cho vào một loại dung môi từ không phân cực đến phân cực: hexan (hoặc eter dầu hỏa), cloroform, diclorometan, etyl acetat, acetonitril, metanol và nước. Độ hòa tan của chất khô sẽ cho biết khá rõ về độ phân cực của mẫu chất khảo sát.

Tuy nhiên nếu mẫu khảo sát là hỗn hợp các hợp chất có tính hòa tan khác nhau, dung dịch khảo sát sẽ cho thấy có phần tan và một phần không tan, cần phải ly tâm hoặc lọc để lấy hai phần tan và không tan, khảo sát riêng. Lưu ý đôi khi hợp chất tan sẽ liên kết với các chất không tan để trở thành chất cũng không tan, xử lý trường hợp này bằng cách khuấy trộn hỗn hợp bằng cơ học hoặc bằng sóng siêu âm (sử dụng bồn sóng siêu âm, ultrasound batch).

b) Phân chia trong hai hệ dung môi không hòa tan vào nhau

Cho chất khô vào lần lượt trong các hệ sau: etyl acetat–nước, cloroform (hoặc diclorometan)–nước, hexan–nước. Quan sát xem chất khô phân chia nhiều vào trong dung môi nào.

Trong trường hợp với một hệ hai dung môi nào đó mà chất khô không tan vào pha nào cả, phải kiểm tra xem chất này có tạo thành *một lớp không tan* hiện diện tại mặt phân cách giữa hai dung môi? Lý do là mẫu chất không tan vào trong dung môi nào nên nó kết tủa, hãy nhân cơ hội đó mà lọc để lấy hợp chất.

3.1.2. Đặc tính acid/ base (pKa)

Thực hành gần giống như phần 3.1.1 nhưng nên sử dụng một số lượng mẫu chất nhiều hơn để thử nghiệm cho kết quả rõ hơn, dễ quan sát.

Chuẩn bị 3 ống nghiệm lớn. Hoà tan mẫu chất khô vào nước để có hỗn hợp huyền phù. Rót dung dịch vào mỗi ống nghiệm trên với lượng thể tích bằng nhau. Nhỏ một hai giọt acid hoặc base vào ống sao cho một ống có dung dịch là pH 3, một ống có pH 7 và một ống có pH10. Rót dung môi l ữu cơ (etyl acetat hoặc cloroform) vào mỗi ống. Trong mỗi ống, các hợp chất sẽ phân chia giữa hai pha như sau.

$$\underbrace{HA}_{\text{Pha hữu cơ}} \rightleftharpoons \underbrace{H_3O^{\oplus} + :A^{\ominus}}_{\text{Pha nước}}$$

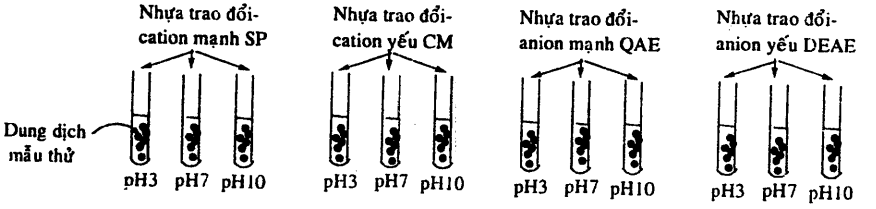
3.1.3. Điện tích của hợp chất

(Đọc thêm bài sắc ký trao đổi ion, phần lựa chọn nhựa trao đổi ion để thực hiện sắc ký trao đổi ion)

Sử dụng 4 loại nhựa trao đổi ion: nhựa trao đổi-cation mạnh SP, nhựa trao đổi-cation yếu CM, nhựa trao đổi-anion QAE, nhựa trao đổi-anion yếu DEAE. Mỗi loại nhựa sử dụng 100 mg nhựa cho mỗi 1 ml dung dịch mẫu chất thử.

Mẫu chất thử khô được hòa vào nước để có một hỗn hợp huyền phù.

Chuẩn bị 12 ống nghiệm lớn. Rót dung dịch huyền phù vào mỗi ống nghiệm với lượng thể tích bằng nhau. Nhỏ một hai giọt acid hoặc base vào các ống này sao cho có ba ống với dung dịch trong ống có pH 3, ba ống có pH 7 và ba ống có pH 10.



Mỗi một loại nhựa trao đổi ion được cho vào 3 ống, như hình vẽ minh họa sau. Khuấy trộn nhẹ dung dịch và nhựa rồi để yên cho nhựa lắng xuống đáy ống nghiệm. Lọc hoặc gạn lấy phần dung dịch nổi bên trên để khảo sát, bằng cách so sánh phổ UV hoặc các kỹ thuật khác giữa phần dung dịch nổi bên trên với dung dịch ban đầu.

Biết rằng nhựa trao đổi- anion yếu dietylaminoetyl (viết tắt là DEAE), chứa nhóm chức hoạt động $-N^+$, sẽ gắn chặt các hợp chất có tính acid mạnh và không gắn được hợp chất có tính acid yếu (vì thế các loại hợp chất này sẽ hiện diện trong phần dung dịch nổi bên trên). Nhựa trao đổi-cation yếu carboxymetyl (viết tắt là CM), chứa nhóm chức hoạt động $-COO^-$, sẽ gắn chặt các hợp chất có tính base mạnh, và không gắn được hợp chất có tính base yếu. Còn nhựa trao đổi cation mạnh QAE sẽ gắn được tất cả các hợp chất có tính acid mạnh và acid yếu; tương tự nhựa SP gắn được tất cả các hợp chất có tính base mạnh và base yếu.

Từ kết quả này có thể suy đoán được hợp chất cần khảo sát có tính acid mạnh/ yếu hoặc tính base mạnh/yếu, từ đó có thể tìm được phương pháp thích hợp để cô lập chúng.

3.1.4. Tính bền nhiệt

Một hợp chất tự nhiên không bền nhiệt có thể là protein, và nó có thể bị loại bỏ (xem mục "Các chất gây cản trở).

3.2. Phân tích hóa -thực vật của cao chiết[4]

Cây cỏ thường có chứa các hợp chất tự nhiên như: steroid, alcaloid, flavonoid, glycosid, saponin, tanin, antraquinon, xanthon, coumarin, iridoid, acid hữu cơ... Để tìm hiểu sơ bộ xem cao chiết có thể chứa loại hợp chất nào trong những loại hợp chất trình bày trên, có thể áp dụng phương pháp sau.

Nguyên tắc căn bản của phương pháp này là tách các hợp chất hữu cơ thành các nhóm khác nhau dựa vào độ hòa tan khác nhau của các hợp chất này trong các dung môi hữu cơ có tính phân cực khác nhau, sau đó mỗi nhóm được phát hiện bằng các thuốc thử đặc trưng.

Tiến trình phân tích sơ bộ hóa–thực vật được trình bày trong sơ đồ 3. Cách thực hiện như sau.

3.2.1. Chiết cao thô với dietyl eter

Trong một erlen 250 ml, cho vào cao chiết thô (5 gam) và dietyl eter (30 ml), khuấy trộn đều trong 5 phút ở nhiệt độ phòng, lọc ngang qua giấy lọc. Lặp lại sự chiết với dietyl eter vài lần cho đến khi dung dịch chiết lần cuối không màu. Vậy, sẽ có dung dịch chiết dietyl eter. Phần bã không tan được giữ lại để thực hiện phần tiếp theo.

Cho dịch chiết dietyl eter vào bình lóng, chiết với 3 x 20 ml dung dịch nước KOH 10%: trong bình lóng có hai lớp là lớp nước kiềm và lớp dietyl eter .

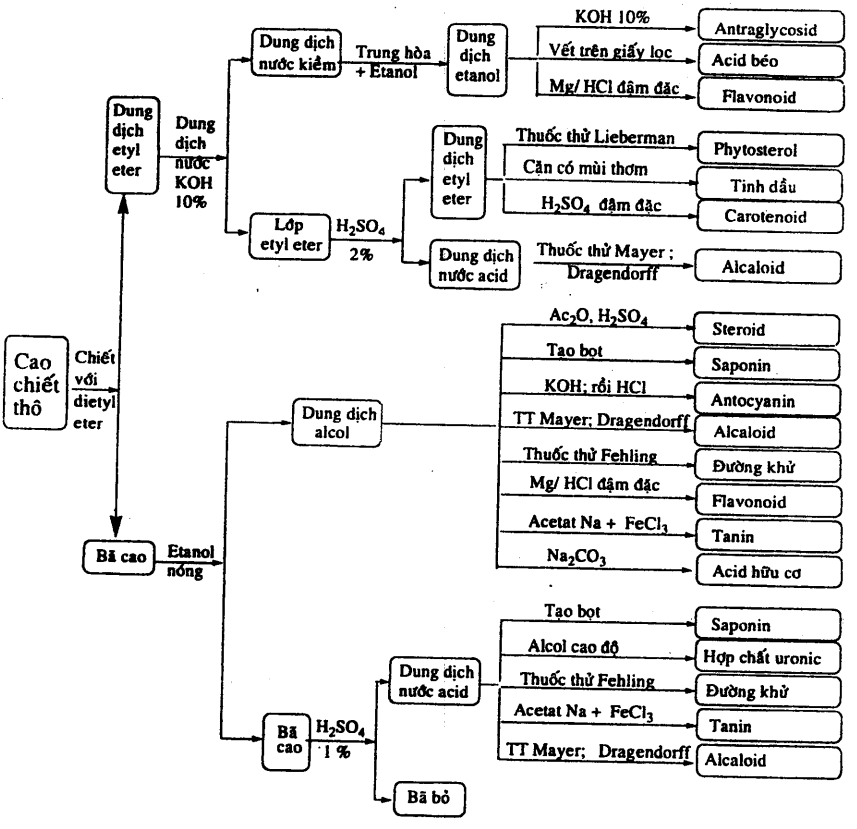
• **Lấy lớp nước kiềm** cho vào becher, trung hoà bằng dung dịch HCl 25% cho đến khi trung tính, sẽ thấy tủa. Lọc bằng phễu để lấy tủa. Hoà tủa này vào 5 ml etanol 90° và chia dung dịch này vào đều trong 3 ống nghiệm.

⁂ Ống 1: Nhỏ vài giọt dung dịch KOH 10%, nếu thấy có màu đỏ, có thể có ***antraglycosid***.

⁂ Ống 2: Acid hóa với HCl đậm đặc, sau đó cho một vài hột Mg kim loại, nếu thấy có màu đỏ, có thể có ***flavonoid***.

⁂ Ống 3: Nhỏ một giọt dung dịch lên tờ giấy lọc, nếu thấy trên tờ giấy lọc có vết mờ, có thể có ***acid béo***.

Sơ đồ 3: Định tính sự hiện diện của các loại hợp chất tự nhiên có trong cao chiết



• **Lấy lớp dietyl eter:** cho vào bình lóng, rửa dung dịch eter này với nước cất (3 x 20 ml), tiếp theo chiết với dung dịch nước H_2SO_4 2% (3 x 5 ml), sẽ có hai lớp: lớp etyl eter và lớp nước acid

⁂ ***Lớp nước acid*** được gom chung lại, định tính với các thuốc thử alcaloid. Thuốc thử Mayer cho tủa màu vàng nhạt; thuốc thử Dragendorff cho tủa màu cam; thuốc thử Bouchardat cho tủa màu nâu.

⁂ ***Lớp etyl eter*** được chia đều vào ba chén sứ và cho bốc hơi đến khô

♣ Chén 1: nếu có mùi thơm có thể có ***tinh dầu***.

♣ Chén 2: nhỏ vài giọt H_2SO_4 đậm đặc, nếu có màu xanh, có thể có ***carotenoid***.

♣ Chén 3: sử dụng thuốc thử Lieberman (Ac_2O/ H_2SO_4): nhỏ 10 giọt anhidrid acetic vào chén để hòa tan cắn, rồi rót hết dung dịch này vào một ống nghiệm. Nhỏ chầm chậm vào dọc theo thành ống nghiệm vài giọt H_2SO_4 đậm đặc, nếu thấy mặt phân cách giữa hai dung dịch trong ống nghiệm có màu vàng lục hoặc lục đỏ, có thể có ***phytosterol*** (steroid thực vật).

3.2.2. Chiết bã cao còn lại bằng etanol 90° nóng

Bả cao sau khi chiết với eter etyl được chiết nóng với etanol 90°. Bả cao được cho vào một erlen 250 ml đặt trên một bếp cách thủy, chiết với etanol 90° (3x 30 ml). Sau mỗi lần chiết, lọc ngang qua một tờ giấy lọc, gộp ba lần chiết lại để có dung dịch alcol. Phần bã không tan được giữ lại để thực hiện phần tiếp theo.

Dung dịch alcol được chia đều thành 6 phần, mỗi phần khoảng 15 ml dung dịch.

- **Phần 1:** Pha loãng dung dịch alcol với 4 lần thể tích nước cất. Kiềm hóa bằng dung dịch NH_4OH đậm đặc, sẽ có tủa. Lọc để có phần tủa và phần dung dịch qua lọc.

⁂ ***Phần tủa*** được hòa với 1 ml cloroform, cho vào ống nghiệm. Thêm vào thuốc thử Lieberman gồm 1 ml anhidrid acetic và nhỏ chầm chậm vào dọc theo thành ống nghiệm vài giọt H_2SO_4 đậm đặc, nếu dung dịch có màu xanh dương lục, có thể có ***steroid***.

⁂ ***Phần dịch lọc*** được acid hoá bằng HCl, sẽ có tủa. Lọc lấy tủa và hoà tủa với 3-4 ml etanol 90° và chia đều vào hai ống nghiệm

♣ Ống 1: cho vài giọt KOH 10%, nếu có màu đỏ, có thể có ***antraglycosid***.

♣ Ống 2: cho vào một ít bột Mg kim loại và vài giọt HCl đậm đặc, nếu có màu đỏ, có thể có ***flavonoid***.

- **Phần 2:** Pha loãng dung dịch alcol với 1 lần thể tích nước cất, rồi rót đều vào hai ống nghiệm.

♣ Ống 1: Trung hòa bằng acetat natri, sau đó thêm dung dịch $FeCl_3$ 5%, nếu có màu xanh đen, có thể có ***tanin***.

♣ Ống 2: Cho vào vài tinh thể Na_2CO_3, nếu có sủi bọt, có thể có ***acid hữu cơ***.

- **Phần 3:** Dung dịch alcol được cô cách thủy cho đến cạn. Hoà cặn này với 3-4 ml H_2SO_4 2%. Dung dịch này được thử với 3 loại thuốc thử alcaloid: Mayer, Dragendorff và Bouchardat. Nếu dương tính với tất cả ba loại thuốc thử, có thể có ***alcaloid***.

- **Phần 4:** Dung dịch alcol được cô cách thủy đến cạn. Hoà cặn này với 4-5 ml nước cất, đun nóng và lọc. Cho vào dung dịch lọc 4-5 giọt thuốc thử Fehling A và 4-5 giọt thuốc thử Fehling B, đun cách thủy, nếu có tủa màu đỏ gạch, có thể có ***đường khử***.

- **Phần 5:** Pha loãng dung dịch alcol với 1 lần thể tích nước cất, rồi rót đều vào 2 ống nghiệm. Ống 1: Acid hóa, nếu có màu đỏ. Ống 2: Kiềm hóa, nếu có màu lục. Nếu cả hai ống nghiệm đều có màu như nêu trên, có thể có ***antocyanosid***.

- **Phần 6:** Chia dung dịch alcol đều vào 2 ống nghiệm và cho bốc hơi cách thủy đến cạn.

♣ Ống 1: Cho vào 5 ml nước cất, bịt miệng ống nghiệm và lắc mạnh theo chiều dài của ống, nếu có bọt bền, có thể có ***saponin***.

♣ Ống 2: Cho vào 0,5 ml cloroform và 0,5 ml anhidrid acetic. Nhỏ chầm chậm vào dọc theo thành ống nghiệm vài giọt H_2SO_4 đậm đặc, nếu ở mặt phân cách xuất hiện màu tím, có thể có ***saponin triterpen;*** nếu ở mặt phân cách xuất hiện màu xanh dương lục, có thể có ***saponin steroid***.

3.2.3. Chiết phần bã cao còn lại với dung dịch nước H_2SO_4 1%

Phần bã không tan, được chiết với dung dịch nước H_2SO_4 1% (3 x 20 ml). Lọc và chia đều vào năm ống nghiệm.

- **Phần 1:** Lắc mạnh theo chiều dài của ống, nếu có bọt bền, có thể có ***saponin***.

- **Phần 2:** Kiềm hóa với dung dịch NH_4OH 10%, chiết với dietyl eter (3x 5 ml). Lóng lấy lớp dietyl eter. Lại chiết lớp dietyl eter này với dung dịch H_2SO_4 1%. Lóng lấy lớp nước, để định tính với ba loại thuốc thử alcaloid: Mayer, Dragendorff và Bouchardat. Nếu dương tính với tất cả ba loại thuốc thử, có thể có ***alcaloid***.

- **Phần 3:** Cho vào dung dịch lọc 4-5 giọt thuốc thử Fehling A và 4-5 giọt thuốc thử Fehling B, đun cách thủy, nếu có tủa màu đỏ gạch, có thể có ***đường khử***.

  Tất cả ba loại thuốc thử, có thể có ***alcaloid***.

- **Phần 4:** Trung hòa bằng acetat natri, sau đó thêm dung dịch $FeCl_3$ 5%, nếu có màu xanh đen, có thể có ***tanin***.

- **Phần 5:** Pha loãng với 2 lần thể tích etanol cao độ, nếu có tủa nhiều, có thể có hợp chất đường loại ***acid uronic***.

3.2.4. Tổng kết kết quả thử nghiệm và nhận xét

Sau khi đã thử nghiệm như phần trình bày trên, cần phải làm bảng tổng kết để có thể đánh giá xem cao chiết có hoặc không có chứa những loại hợp chất tự nhiên nào. Bảng đánh giá có thể được trình bày như thí dụ trong bảng 7.

Bảng đánh giá được trình bày với các ký hiệu (-) nghĩa là âm tính, không có hiện diện và ký hiệu (+) nghĩa là dương tính, có hiện diện. Đôi khi người ta ghi thêm các ký hiệu (++) hoặc (+++) nghĩa là hiện diện ở nồng độ cao hơn. Các ký hiệu (+), (++) hoặc (+++) chỉ có ý nghĩa so sánh tương đối trong cùng một điều kiện thí nghiệm, giúp cho người quan sát đánh giá rõ hơn về hàm lượng của một loại hợp chất trong cao chiết. Thí dụ trong bảng 7 hợp chất "đường khử" hiện diện (+) trong dung dịch dietyl eter, nhưng hiện diện nhiều hơn gấp ba lần trong dung dịch chiết etanol nên được ghi (+++).

Từ sơ đồ 3 nhận thấy một loại hợp chất tự nhiên nào đó, thí dụ steroid, có thể hoà tan vào hai loại dung môi khác nhau là dietyl eter và etanol. Điều này có nghĩa là mẫu cây có chứa hai hợp chất steroid: một hòa tan trong

dietyl eter và một hòa tan trong etanol. Cả hai đều là loại steroid nhưng có gắn thêm những nhóm chức có tính phân cực khác nhau.

Trong cùng một cây cũng có thể có nhiều hợp chất tuy cùng là loại alcaloid nhưng có thể có khung sườn khác nhau và mang các nhóm chức khác nhau nên có độ phân cực khác nhau. Vì vậy có alcaloid tan trong dung môi dietyl eter mà cũng có alcaloid không tan trong dietyl eter, nhưng tan trong etanol.

Bảng 7: Thí dụ về tóm tắt sự hiện diện của các hợp chất tự nhiên có trong cao chiết.

Loại dung dịch chiết			Thuốc thử	Kết quả	Hợp chất tự nhiên
Etyl eter	Etanol	Acid 1%			
+	+		KOH 10%	Màu đỏ nhạt	Antraglycosid
+			Nhỏ dịch trên giấy lọc	Để lại vết ố	Acid béo
-	+		Mg/ HCl đậm đặc	Có vòng màu đỏ	Flavonoid có tính phân cực
+			Thuốc thử Lieberman	Có màu lục đỏ	Phytosterol
+			Bốc hơi còn lại cắn	Có mùi thơm	Tinh dầu
-			H_2SO_4 đậm đặc	Không màu	Không có carotenoid
+	-		Mayer, Bouchardat, Dragendorff	Có tủa màu	Alcaloid có tính ít phân cực
	-	-	Lắc mạnh dung dịch	Không có bọt	Không saponin
	+	++	$FeCl_3$	Màu lục đen	Tanin
	-		Na_2CO_3	Không sủi bọt	Không có acid hữu cơ
	+	+++	Thuốc thử Fehling A, B	Tủa màu đỏ gạch	Đường khử
		+	Pha loãng với etanol 90°	Có tủa nhiều	Acid uronic

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. **Richard J.P. Cannell.** *Natural products isolation.* Humana Press. Totowa, New Jersey. 1998.

[2]. **Smith R.M.**. *Supercritical fluid extraction of natural products.* LC-GC Int., 8-15, 1996.

[3]. **Jennings D.W., Deutsch H.M., Zalkow L.H.** *Supercritical extraction of taxol from the bark of Taxus brevifolia.* J. Supercritical Fluids, **5**, 11-6, 1992.

[4]. **Nguyễn Khác Quỳnh Cứ.** *Bài giảng chiết xuất dược liệu.* Bộ môn Dược liệu. Đại học Y - Dược TP. Hồ CHí Minh, 45-97, 1999.

[5]. **Ralph L., Shrinder, David Y. Curtin, Terence C. Morill.** *The systematic identification of organic compounds. A laboratory manual.* John Wiley and Sons. New York. Toronto, 5-57, 1995.

CÁC PHƯƠNG PHÁP CÔ LẬP HỢP CHẤT HỮU CƠ

Chương 2

PHƯƠNG PHÁP NHẬN DANH CÁC LOẠI HỢP CHẤT TỰ NHIÊN

Từ mẫu cây, sử dụng những kỹ thuật chiết tách khác nhau để có được cao chiết alcol toàn phần hoặc các loại cao có tính phân cực khác nhau. Áp dụng phương pháp phân tích sơ bộ về hoá-thực vật để biết trong cao chiết có thể chứa các loại hợp chất tự nhiên nào. Sau đó, cần tiến hành xác định sự hiện diện của các loại hợp chất tự nhiên nói trên bằng những phương pháp cụ thể hơn, để có thể chọn các biện pháp xử lý thích hợp nhằm cô lập các hợp chất tinh chất.

1. ALCALOID

1.1. Đại cương

Alcaloid là nhóm hợp chất tự nhiên hiện diện khá nhiều trong các họ thực vật với cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học rất đa dạng. Trên thực tế có rất nhiều loài thực vật có alcaloid nhưng ở mức độ vết hoặc tỉ lệ phần vạn. Để giới hạn với ý nghĩa thực tiễn, một cây được xem là có alcaloid phải chứa ít nhất 0,05% alcaloid so với mẫu cây khô.

Do cách phân loại dựa vào cấu trúc nhân cơ bản không thể đáp ứng được cho số lượng alcaloid rất nhiều và đa dạng, nên để tiện lợi, các alcaloid được chia thành ba loại: alcaloid thật, protoalcaloid và giả-alcaloid (Pseudoalcaloid). Alcaloid thật là những hợp chất có hoạt tính sinh học, luôn có tính base, thường có chứa nguyên tử nitơ trong vòng dị hoàn, thường được sinh tổng hợp từ amino acid, phân bố giới hạn trong thực vật và hiện diện trong cây dưới dạng muối của một acid hữu cơ, ngoại trừ: colchicin, acid

aristolochic, alcaloid tứ cấp. Các alcaloid loại này thường được chia thành nhóm theo nguồn gốc sinh tổng hợp của chúng (ornithin, lysin, phenylalanin, tryptophan, histidin, acid antranilic....) hơn là theo vòng dị hoàn.

Các protoalcaloid được xem là những amin có hoạt tính sinh học kể cả mescalin và *N, N*-dimetyltryptamin. Chúng là những amin đơn giản, được tổng hợp từ các amino acid, trong đó nguyên tử nitơ không ở trong vòng dị hoàn.

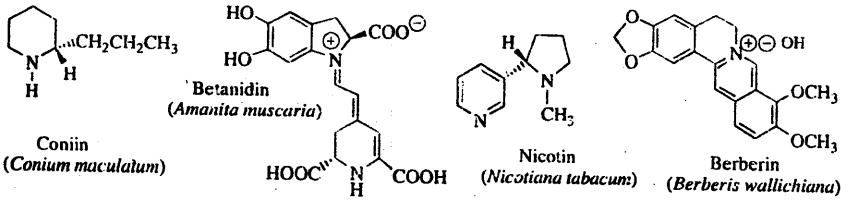
Các giả-alcaloid, là những hợp chất không bắt nguồn từ những amino acid, bao gồm hai nhóm hợp chất lớn là alcaloid steroid và alcaloid terpenoid (thí dụ conessin) và purine (cafein).

Hầu hết các alcaloid hiện diện trong cây có hoa, loại 2 lá mầm, nhưng người ta cũng thấy alcaloid trong động vật, côn trùng, sinh vật biển, vi sinh vật..

Chỉ có một đặc điểm chung thường gặp là tên của các alcaloid thường tận cùng bằng chữ "ine".

Các đặc tính hóa - lý của alcaloid

Đa số alcaloid không màu, ở trạng thái kết tinh rắn với điểm nóng chảy xác định hoặc có khoảng nhiệt độ phân hủy. Một vài alcaloid ở dạng nhựa vô định hình, một vài alcaloid ở dạng lỏng (nicotin, coniin) và một vài alcaloid có màu (berberin màu vàng, betanidin màu đỏ).



Alcaloid là những hợp chất có tính base yếu, do sự có mặt của nguyên tử nitơ. Tính base của các alcaloid cũng khác nhau tùy theo sự hiện diện của các nhóm thế R (mang các nhóm chức khác nhau) gắn trên nguyên tử nitơ. Các alcaloid tính base yếu thì phải cần môi trường acid mạnh để tạo thành muối, tan trong nước.

Các alcaloid ở dạng base tự do hầu như không tan trong nước, nhưng thường tan tốt trong dung môi hữu cơ như cloroform, dietyl eter, alcol bậc thấp. Các muối của alcaloid thì tan trong nước, alcol và hầu như không tan trong dung môi hữu cơ như cloroform, dietyl eter, benzen. Các protoalcaloid và giả-alcaloid thường dễ tan trong nước.

Tính hòa tan của các alcaloid đóng vai trò quan trọng trong việc chiết tách alcaloid ra khỏi cây cũng như trong kỹ nghệ dược phẩm điều chế dạng thuốc để uống.

Nói chung, alcaloid là hợp chất tương đối bền, tuy vậy, một số hợp chất thuộc loại dẫn xuất của indol dễ bị hủy hoặc biến chất khi gặp ánh sáng hoặc các tác nhân oxid hóa.

1.2. Phương pháp định tính sự hiện diện của alcaloid trong bột cây[1]

Để phát hiện sự hiện diện của alcaloid trong cây người ta thường áp dụng nguyên tắc thử của Webb [1], cách thử này gồm cả hai phần như sau:

- **Phần 1**: Bột cây xay nhuyễn (5 g) và dung dịch nước 1% H_2SO_4 được cho vào erlen và đun nhẹ, trong 1 giờ. Lọc, lấy dịch lọc để thử nghiệm với cả ba loại thuốc thử: Mayer, Dragendorff, Wagner.

Quan sát kết tủa, nếu có kết tủa theo qui định là dương tính. Tuy vậy, nếu không có kết tủa, chưa thể kết luận là không có alcaloid mà phải tiếp tục thử nghiệm phần 2.

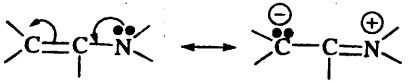
- **Phần 2**: Bột cây xay nhuyễn (5 g) được ngâm trong dung dịch Prollius là hỗn hợp gồm cloroform: etanol 95°: NH_4OH đậm đặc, theo tỉ lệ thể tích là 8: 8:1, môi trường phải có tính base. Ngâm nguội trong 24 giờ, ở nhiệt độ phòng, thỉnh thoảng lắc trộn. Lọc và đuổi dung môi đến cạn, thu được cặn. Hòa tan cặn trong dung dịch nước HCl 1%, đun ấm cho dễ tan. Lọc, lấy dịch lọc để thử nghiệm với cả ba loại thuốc thử: Mayer, Dragendorff, Wagner.

Cần phải thực hiện cả hai phần thử nghiệm vì mỗi thử nghiệm đều có ưu và nhược điểm.

* *Bột cây được chiết với dung dịch nước-acid:* dung dịch này có thể chiết tất cả các alcaloid ở dạng base tự do (N: sẽ biến thành ^+NH tan trong

nước), alcaloid dạng tứ cấp N^+, dạng N-oxid ($N^+ \rightarrow O$), dạng glycosid, alcaloid loại có tính phân cực mạnh tuy nhiên dung dịch này cũng chiết luôn những hợp chất như: coumarin, polyphenol, purine, amino acid, protein, các hợp chất có chứa nitơ... là những hợp chất tuy không phải là alcaloid nhưng do tan tốt vào dung dịch chiết nên có thể cho kết quả dương tính với thuốc thử.

Phương pháp này không chiết tốt các alcaloid có tính base yếu, vì cần môi trường acid mạnh mới có thể tạo thành muối, tan trong nước. Cũng không chiết được các alcaloid có cấu trúc đặc thù như thí dụ sau, trong trường hợp đó đôi điện tử tự do trên nitơ có khuynh hướng dịch chuyển về C=C nên nitơ khó nhận proton H^+ để tạo thành muối, tan trong nước.



✷ *Bột cây được chiết với dung môi hữu cơ – kiềm*: dung dịch này chiết tốt những alcaloid dạng base tự do (N:) có tính phân cực kém và tính base yếu, cũng như các alcaloid có cấu trúc đặc thù –C=C–N–.

Tuy nhiên, dung môi hữu cơ – kiềm không chiết được những alcaloid dạng N-oxid ($N^+ \rightarrow O$), dạng N^+ tứ cấp, dạng glycosid tan tốt trong nước.

Ghi nhận kết quả: Kết quả thử nghiệm dương tính trên bột cây được trình bày bằng ký hiệu (-) với ý nghĩa không có alcaloid, (+) là hiện diện yếu, (++) là vừa, (+++) là mạnh. Nếu có thể định lượng thì hàm lượng alcaloid thô tính trên bột cây khô: nếu < 0,01% là thấp; 0,01- 0,1% là trung bình; > 0,1% là cao.

1.3. Các thuốc thử để định tính alcaloid [1]

Có rất nhiều thuốc thử cho phản ứng tạo màu hoặc tạo kết tủa với alcaloid, nhưng các thuốc thử này cũng có thể cho kết quả dương tính với các hợp chất như: coumarin, polyphenol, purin, amino acid, protein, acid triterpen, hợp chất có chứa nitơ...

Có ba thuốc thử thông dụng là: Mayer, Dragendorff, Wagner; ngoài ra còn một số thuốc thử khác để phát hiện các loại alcaloid đặc thù.

a) Thuốc thử Mayer

Hòa tan 1,36 g $HgCl_2$ trong 60 ml nước cất và hòa tan 5 g KI trong 10 ml nước cất. Hỗn hợp hai dung dịch và thêm nước cho đủ 100 ml.

Nhỏ vài giọt thuốc thử Mayer vào *dung dịch acid loãng có chứa alcaloid*, nếu có alcaloid sẽ xuất hiện tủa màu trắng hoặc vàng nhạt. Cần lưu ý vì tủa tạo thành sẽ có thể hòa tan trở lại trong lượng thừa thuốc thử hoặc hòa tan bởi AcOH, etanol có sẵn trong dung dịch thử.

b) Thuốc thử Dragendorff

Hòa tan 8,0 g Nitrat bismuth $Bi(NO_3)_3,H_2O$ trong 25 ml HNO_3 30% (d =1,18). Hòa tan 28 g KI và 1 ml HCl 6N trong 5 ml nước cất. Hỗn hợp 2 dung dịch, để yên trong tủ lạnh 5°C cho tủa màu sậm và tan trở lại, lọc và thêm nước cho đủ 100 ml. Dung dịch màu cam-đỏ được chứa trong chai màu nâu để che ánh sáng, cất trong tủ lạnh, có thể giữ lâu được *vài tuần*.

Dung dịch dùng để định tính sự hiện diện của alcaloid bằng ống nghiệm hoặc để làm dung dịch phun xịt lên bản mỏng.

- Để định tính bằng ống nghiệm: dung dịch acid loãng có chứa alcaloid đựng trong ống nghiệm, nhỏ vài giọt thuốc thử Dragendorff vào ống nghiệm nếu có alcaloid sẽ xuất hiện tủa màu cam-nâu. (Tủa alcaloid có thể được thu hồi bằng cách xử lý với Na_2CO_3 và chiết với dietyl eter).

Thuốc thử không phản ứng với hợp chất amino acid, nhưng có thể cho kết quả dương tính với những hợp chất có nhóm carbonyl tiếp cách như pyron, cinamaldehyd....

- Để phun xịt lên tấm bản mỏng: Pha dung dịch phun xịt: trong một bình phun xịt, cho vào lần lượt theo thứ tự: 20 ml nước; 5 ml HCl 6N; 2 ml dung dịch thuốc thử Dragendorff ở trên và 5 ml NaOH 6N. Dung dịch nếu trữ trong tủ lạnh có thể để lâu 10 ngày. Sử dụng dung dịch này phun xịt lên bản mỏng, nếu có alcaloid sẽ cho vết màu cam - đỏ.

c) Thuốc thử Wagner

Hòa tan 1,27 g iod I_2 và 2 g KI trong 20 ml nước cất. Thêm nước cho đủ 100 ml. Nhỏ vài giọt thuốc thử Wagner vào *dung dịch acid loãng có chứa*

alcaloid, nếu có alcaloid sẽ xuất hiện tủa màu nâu.

d) Thuốc thử Iodoplatinat (dung dịch để phun xịt lên bản mỏng, phát hiện alcaloid có nitơ trong vòng dị hoàn)

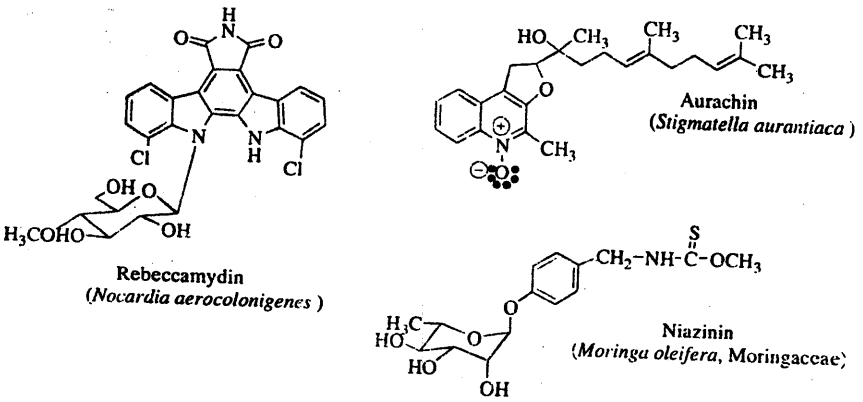
Dung dịch clorur platin 10% (3 ml) và 97 ml nước. KI 6g và 94 ml nước. Hỗn hợp 2 dung dịch này lại, trữ dung dịch trong chai lọ màu nâu.

1.4. Phương pháp chiết tách alcaloid ra khỏi cây [1; 3]

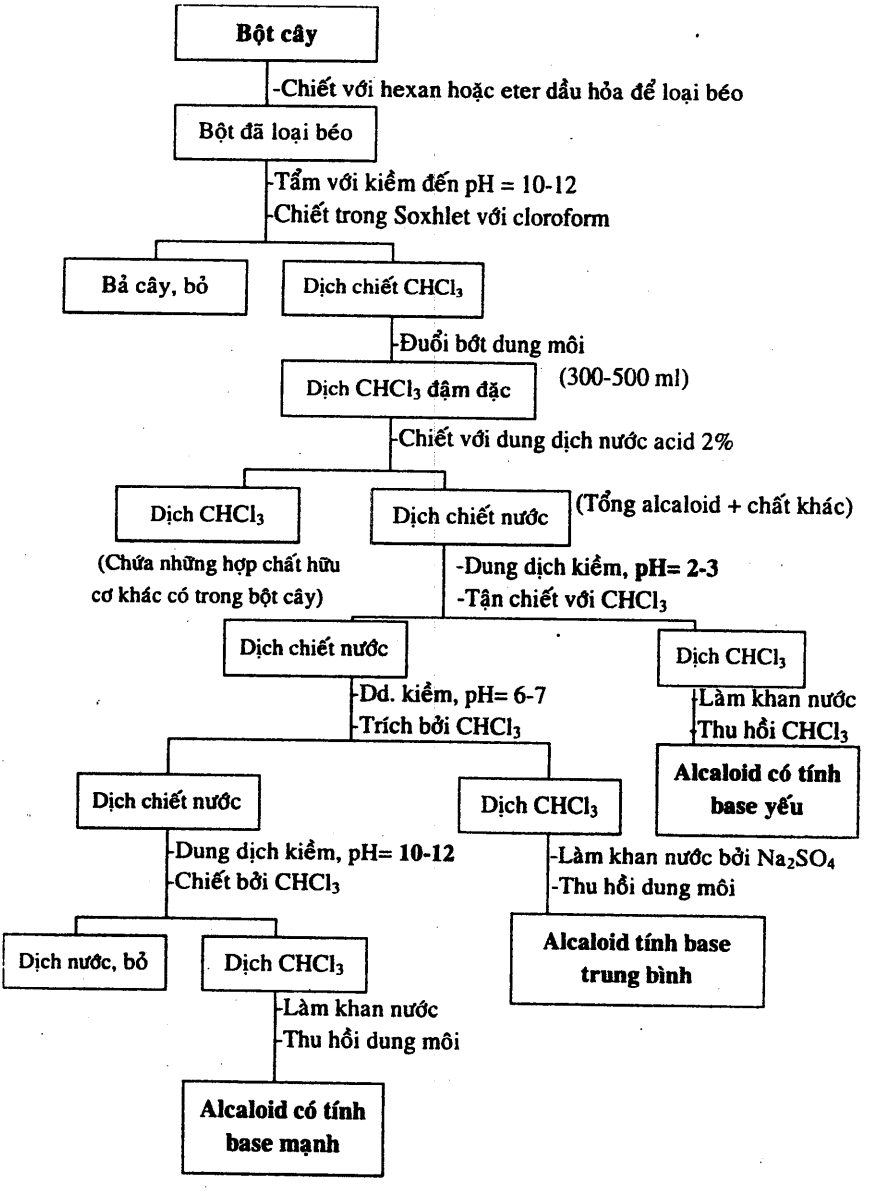
Có hai phương pháp căn bản để chiết tách cũng như sơ chế các alcaloid ra khỏi bột cây khô, dựa vào tính base đặc trưng của các alcaloid. Người ta có thể chỉnh sao cho alcaloid ở dạng base tự do thì alcaloid sẽ tan tốt trong dung môi hữu cơ và chỉnh sao cho alcaloid ở dạng muối (N^+) thì sẽ tan tốt trong nước. Tuy vậy, mỗi phương pháp đều có ưu và nhược điểm riêng, tùy theo cần chiết tách loại alcaloid nào để chọn phương pháp thích hợp.

1.4.1. Phương pháp chiết tách alcaloid bằng dung môi hữu cơ

Phương pháp được trình bày tổng quát trong sơ đồ 1.



Sơ đồ 1: Phương pháp chiết tách alcaloid ra khỏi bột cây bằng dung môi hữu cơ


Bột cây
-Chiết với hexan hoặc eter dầu hỏa để loại béo
Bột đã loại béo
-Tẩm với kiềm đến pH = 10-12
-Chiết trong Soxhlet với cloroform
Bả cây, bỏ
Dịch chiết $CHCl_3$
-Đuổi bớt dung môi
Dịch $CHCl_3$ đậm đặc
(300-500 ml)
-Chiết với dung dịch nước acid 2%
Dịch $CHCl_3$
(Chứa những hợp chất hữu cơ khác có trong bột cây)
Dịch chiết nước
(Tổng alcaloid + chất khác)
-Dung dịch kiềm, pH= 2-3
-Tận chiết với $CHCl_3$
Dịch chiết nước
Dịch $CHCl_3$
-Dd. kiềm, pH= 6-7
-Trích bởi $CHCl_3$
-Làm khan nước
-Thu hồi $CHCl_3$
Alcaloid có tính base yếu
Dịch chiết nước
Dịch $CHCl_3$
-Dung dịch kiềm, pH= 10-12
-Chiết bởi $CHCl_3$
-Làm khan nước bởi Na_2SO_4
-Thu hồi dung môi
Dịch nước, bỏ
Dịch $CHCl_3$
Alcaloid tính base trung bình
-Làm khan nước
-Thu hồi dung môi
Alcaloid có tính base mạnh

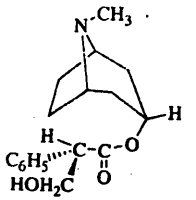
• ***Nguyên tắc tổng quát***: Bột cây được tẩm với dung dịch kiềm để chuyển đổi các alcaloid ở dạng muối trở thành dạng base tự do; kế tiếp, bột cây tẩm này được chiết với một trong các loại dung môi hữu cơ như: benzen, dietyl eter, cloroform, etyl acetat ....

• ***Ưu và nhược điểm của phương pháp***

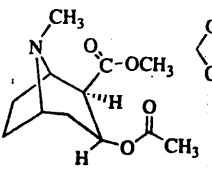
Do tẩm với dung dịch kiềm để biến các muối (N^+) thành dạng alcaloid base tự do, rồi chiết với cloroform nên phương pháp này không chiết được những alcaloid dạng N-oxid ($N^+ \rightarrow O$); dạng N^+ tứ cấp. Thêm nữa, việc sử dụng dung môi có tính phân cực trung bình như cloroform sẽ không chiết tốt các alcaloid glycosid, các alcaloid loại phân cực mạnh.

Muốn khắc phục, trước khi chiết tách cần sử dụng bột kẽm Zn/HCl để khử dạng N-oxid thành dạng N tự do hoặc thủy giải alcaloid glycosid bằng dung dịch acid; hoặc đổi dung môi cloroform bằng loại dung môi khác có tính phân cực mạnh hơn.

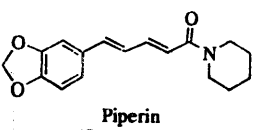
Việc lựa chọn nồng độ kiềm cho giai đoạn này cần phải có sự nghiên cứu kỹ. Việc tẩm bột cây bằng kiềm với nồng độ mạnh/ yếu khác nhau có thể có những ảnh hưởng. Đối với alcaloid có tính base tương đối mạnh, nếu dùng dung dịch kiềm yếu để kiềm hóa thì có thể không đẩy được alcaloid ra khỏi muối của nó. Đối với alcaloid có chứa nhóm chức ester, amid, thí dụ như atropine, cocain, piperin ... nếu dùng kiềm nồng độ quá mạnh có thể cắt đứt nối này. Đối với alcaloid có nhóm –OH phenol, thí dụ như morphin, nếu dùng kiềm mạnh như NaOH, sẽ tạo muối phenolat không tan trong dung môi hữu cơ như cloroform.



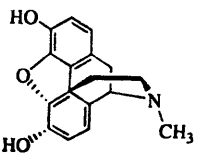
Atropin
(*Atropa belladonna*)



Cocain
(*Erythroxylum coca*)



Piperin
(*Piper nigrum*)



Morphin
(*Papaver somniferum*
Papaveraceae)

• ***Quá trình thực hiện:*** theo các bước như sau:

a) Loại béo bột cây: nếu mẫu cây có chứa nhiều chất béo, chất màu thì đầu tiên cần loại béo thật kiệt bằng eter dầu hỏa hoặc hexan. Sau đó, bột được phơi khô tự nhiên ngoài không khí.

b) Tẩm bột cây với dung dịch amoniac NH_4OH 10-25% (hoặc dung dịch Na_2CO_3; NaOH; $CaCO_3$, vôi CaO...). Dung dịch kiềm được trộn đều với bột cây sao cho toàn bộ bột cây được tẩm thấm đều; dùng giấy pH có thấm nước để kiểm tra xem có đạt pH 10-12. Để yên vài giờ.

c) Chiết bột tẩm với dung môi hữu cơ: Thường chiết bằng máy Soxhlet để dễ trích kiệt, dung môi thường dùng là cloroform. Dịch chiết cloroform được cô đậm đặc còn lại khoảng 300-500 ml.

d) Dịch cloroform được chiết lỏng–lỏng bởi dung dịch nước acid 1- 2%: Cho dung dịch cloroform này vào bình lóng và chiết lỏng–lỏng với dung dịch acid hữu cơ hoặc vô cơ 1-2% /pha trong nước. Các acid sử dụng có thể là H_2SO_4, HCl, acid tartaric, acid acetic... Chiết nhiều lần, mỗi lần một ít dung dịch nước acid (*n* x 30 ml).

Theo dõi quá trình chiết alcaloid ra khỏi lớp cloroform bằng cách kiểm tra dịch chiết lần thứ *n* với các thuốc thử alcaloid, đến khi âm tính với thuốc thử thì xem như đã chiết kiệt. Gom các lần chiết lại thu được dịch chiết nước acid. Dịch này chứa *tổng các alcaloid và một số tạp: clorophyl, nhựa...* Muốn loại bớt tạp thì chiết vài lần với eter dầu hỏa, etyl eter, cloroform. Trong một số trường hợp, có thể sử dụng dịch này để định lượng sơ bộ hàm lượng alcaloid bằng phương pháp cân hoặc phương pháp so quang.

Lưu ý: Cần sử dụng đủ lượng acid mới có thể chuyển hết các alcaloid dạng base tự do, biến thành alcaloid dạng muối để tan được trong nước; nếu không, alcaloid vẫn còn ở lại trong lớp cloroform.

Giai đoạn này thường bị nhũ hóa. Nếu bị nhủ ít, ly tâm hoặc lọc qua giấy lọc khô; nếu nhũ hóa nhiều, phải để lắng một thời gian trong tủ lạnh.

e) Trong trường hợp dung dịch nước acid có nhiều loại alcaloid khác nhau và mong muốn tách riêng các phân đoạn chứa các loại alcaloid, có thể áp dụng phương pháp chiết phân đoạn, như sau.

- Rót dung dịch acid vào bình lóng, chỉnh sao cho dung dịch nước acid đạt pH= 2-3. Dùng cloroform để chiết những alcaloid có tính base yếu.

- Sau khi *đã chiết hết* các alcaloid base yếu, thêm dung dịch kiềm vào bình lóng để chỉnh dung dịch nước về pH = 6 - 7, dùng cloroform để chiết những alcaloid có tính base trung bình.

- Sau khi *đã chiết hết* các alcaloid base trung bình, thêm dung dịch kiềm vào bình lóng để chỉnh dung dịch nước về pH = 10 - 12, rồi lại dùng cloroform để chiết những alcaloid có tính base mạnh.

Chú ý: Trong mỗi giai đoạn với pH cố định, cần chiết cho kiệt hết các alcaloid có tính base yếu rồi mới chỉnh pH để môi trường kiềm mạnh hơn, mới giải phóng nổi những alcaloid có tính kiềm mạnh hơn hiện đang ở dạng muối, biến đổi trở về dạng base tự do, nghĩa là từ dạng muối (tan trong nước) trở thành dạng base hữu cơ (tan trong dung môi hữu cơ cloroform).

f) Trong trường hợp dung dịch nước acid có nhiều loại alcaloid và muốn lấy tất cả các alkaloid, kiềm hóa dung dịch nước acid đến pH= 10-12 và chiết kiệt bằng cloroform.

g) Thu cao cloroform thô: Dịch chiết cloroform được gom lại, làm khan nước bằng Na_2SO_4. Lọc và thu hồi dung môi, sẽ có alcaloid thô.

1.4.2. Phương pháp chiết tách alcaloid bằng dung dịch nước acid

Phương pháp này được trình bày tổng quát trong sơ đồ 2.

• ***Nguyên tắc tổng quát*:** Bột cây được tận chiết với metanol, dung môi rất tốt có thể chiết hết tất cả các alcaloid ở dạng base tự do, alcaloid dạng tứ cấp N^+, dạng *N*-oxid ($N^+ \rightarrow O$), dạng glycosid, alcaloid loại phân cực mạnh và dĩ nhiên chiết luôn những hợp chất hữu cơ khác.

• ***Ưu và nhược điểm của phương pháp*:** Khi sử dụng dung môi metanol, sẽ chiết hết tất cả, nên sẽ khó khăn trong quá trình tách riêng các alcaloid và các hợp chất hữu cơ.

• ***Quá trình thực hiện*:** thực hành theo các bước như sau

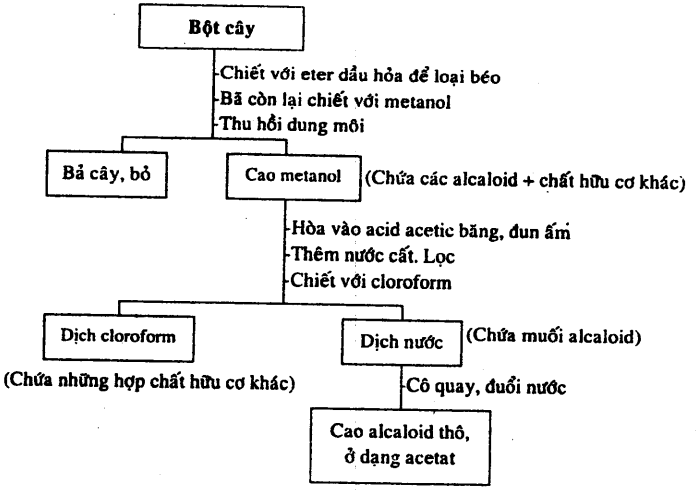
- Tận chiết bột cây với metanol, thu hồi dung môi, được cao metanol.

- Hòa tan cao metanol vào một lượng tối thiểu acid acetic băng, có đun ấm ấm cho tan tốt nhằm biến đổi tất cả các alcaloid dạng base tự do và alcaloid dạng muối, thành dạng muối acetat, tan trong nước.

- Thêm nước cất vào dung dịch, cho đến khi không còn thấy tủa trong dung dịch. Khuấy đều. Lọc bỏ cặn. Dung dịch nước này được chiết bằng bình lóng với dung môi hữu cơ như cloroform, dietyl eter... nhằm loại bỏ những hợp chất hữu cơ khác không phải là alcaloid.

- Thu hồi dung dịch nước này ở áp suất kém, cho cao sệt có chứa tổng alcaloid thô ở dạng muối acetat, hầu như đã loại được gần hết những hợp chất không phải là alcaloid.

Sơ đồ 2: Phương pháp tách chiết alcaloid ra khỏi bột cây bằng dung dịch nước acid



Trong trường hợp muốn tiết kiệm dung môi hữu cơ, có thể thực hành như sau: cao tổng alcaloid thô được hòa vào nước, dùng dung dịch acid để chỉnh dung dịch về pH = 3. Khuấy lọc. Dùng dung dịch kiềm chỉnh về pH = 10, để yên qua đêm, sẽ có tủa. Lọc lấy tủa. Hòa tủa vào nước, chỉnh về pH = 3, rồi lại cho kết tủa bằng dung dịch kiềm. Thực hiện vài lần sẽ thu được alcaloid thô. Kết tinh lại alcaloid trong dung môi.

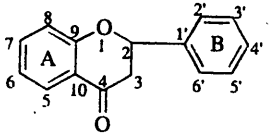
- Tiếp theo, có thể tách riêng những alcaloid bằng sắc ký cột, nhất là sắc ký trao đổi cation.

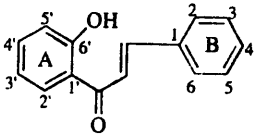
2. FLAVONOID

2.1. Đại cương

Flavonoid là những hợp chất màu phenol thực vật, tạo nên màu cho rất nhiều rau, quả, hoa... Phần lớn các flavonoid có màu vàng (do từ flavus là màu vàng); tuy vậy, một số sắc tố có màu xanh, tím, đỏ, không màu cũng được xếp vào nhóm này vì về mặt hóa học, chúng có cùng khung sườn căn bản.

Flavonoid có cấu trúc cơ bản là 1,3-diphenylpropan, nghĩa là 2 vòng benzen A và B nối nhau qua một dây có 3 carbon, nên thường được gọi là C_6 -C_3 -C_6. Cách đánh số tùy theo dây C_3 đóng hay hở. Nếu dây C_3 đóng, thì đánh số bắt đầu từ dị vòng với dị nguyên tố oxigen mang số 1 rồi đánh tiếp đến vòng A, còn vòng B đánh số phụ. Nếu dây C_3 hở, đánh số chính trên vòng B và đánh số phụ trên vòng A.





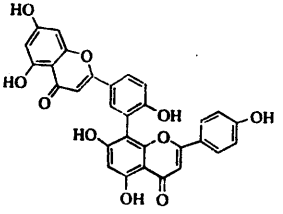
Thường các flavonoid có mang một hoặc nhiều nhóm –OH ở vị trí 5 và 7 trên nhân A và ở vị trí 3, 4, 5 trên nhân B. Các flavonoid có thể hiện diện ở dạng tự do hoặc dạng glycosid. Các đường thường gặp nhất là đường D-glucose, kế đó là D-galactose, L-rhamnose, L-arabinose, D-xylose, D-apiose và acid uronic.

Các flavonoid được phân thành nhiều nhóm với cấu trúc cơ bản khác nhau, dựa vào việc sinh tổng hợp, được trình bày trong sơ đồ 3.

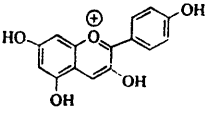
Chalcon hiện diện ít trong tự nhiên, flavanol và flavanonol cũng hiếm gặp; flavon và flavonol phân bố rộng rãi trong thiên nhiên. Các glycosid flavonol như: rutin, quercitrin, kaempherol rất thường xuất hiện. Do có nhiều nhóm –OH phenol nên các flavonoid có thể liên kết với nhau để tạo thành

phức tạp hơn hoặc tạo với các hợp chất khác trong cây thí dụ kết hợp với đường để tạo thành glycosid....

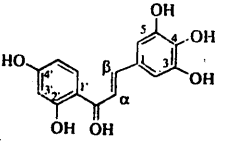
Các flavonoid thường dễ kết tinh và thường có màu. Flavon có màu vàng nhạt hoặc màu cam; flavonol có màu vàng đến vàng nhạt; chalcon có màu vàng đến cam đỏ. Các isoflavon, flavanon, flavanonol, leucoantocyanidin, catechin kết tinh không màu. Antocyanidin thường hiện diện ở dạng glycosid thí dụ như: pelargonidin, cyanidin, delphinidin... tạo màu xanh dương, đỏ, tím cho những cánh hoa và trái.



3',8-Biapigenin
(*Metasequoia glypgelbe* Krist.)

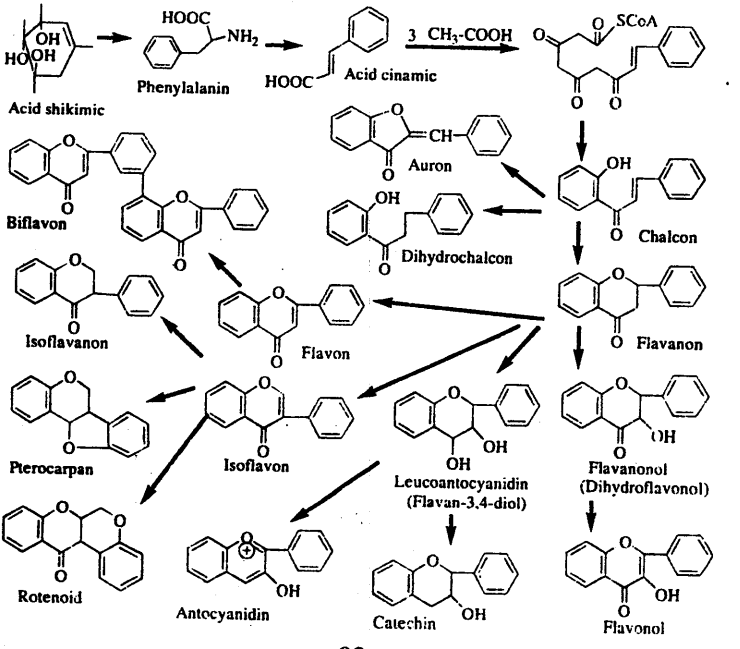


Pelargonidin
(*Viola tricolor*)



Robtein
(2',3,4.4',5-Pentahydroxychalcon)
(*Robinia pseudoacucia*)

Sơ đồ 3: Sự sinh tổng hợp các flavonoid



Bảng 1: Màu của flavonoid dưới ánh đèn tử ngoại khi *có và không có* xử lý với kiềm.

Flavonoid	K hông có dung dịch kiềm		Phun xịt với dung dịch kiềm	
	Ánh sáng thường (VIS)	UV_{365}	Ánh sáng thường (VIS)	UV_{365}
Flavon	Không màu đến vàng nhạt	Nâu Xanh dương	Vàng	Vàng
Flavonol	Vàng nhạt đến vàng xậm	Vàng, vàng- lục	Vàng	Vàng
Flavanon	Không màu	Không màu	Không màu	Vàng
Flavonol-3-glycosid	Không màu đến vàng nhạt	Nâu tối	Vàng	Vàng, vàng-lục
Catechin	Không màu	Không màu	Không màu	Vệt tối
Antocyanin	Đỏ	Nâu tối	Xanh dương	Vệt tối
Chalcon	Vàng sẩm	Vàng nâu xậm	Vàng cam-cam đỏ	Cam-đỏ tía

2.2. Các thuốc thử để định tính sự hiện diện của flavonoid

Có nhiều phương pháp để phát hiện flavonoid.

2.2.1. Phân biệt sơ bộ bằng hơi amoniac

Dưới ánh đèn tử ngoại UV_{365} và sự hiện diện của hơi ammoniac, các flavonoid sẽ thay đổi màu sắc.

Cao chiết cây được chấm thành hai chấm riêng biệt lên trên cùng một tấm sắc ký lớp mỏng, giải ly. Cắt bản mỏng ra làm đôi: một bản để tự nhiên, còn một bản đặt trong bình kín bão hòa bằng hơi amoniac NH_3 và tiếp theo phun xịt bản bởi dung dịch 1% KOH/etanol. Lần lượt quan sát màu của các vết trên 2 bản: dưới ánh sáng thường và dưới ánh đèn tử ngoại 365nm. Sự khác nhau về màu tuỳ theo hợp chất flavonoid được trình bày trong bảng 1.

2.2.2. Tác dụng với H_2SO_4 đậm đặc

Hòa tan hợp chất flavonoid vào H_2SO_4 đậm đặc: flavon và flavonol cho màu vàng đậm đến màu cam và có phát huỳnh quang đặc biệt. Chalcon, auron cho màu đỏ hoặc xanh dương - đỏ. Flavanon cho màu từ cam đến đỏ.

2.2.3. Tác dụng với dung dịch 1% NaOH/ etanol

Nhỏ dung dịch NaOH vào một dung dịch flavonoid/ hòa tan trong etanol, sẽ có màu từ vàng đến cam-đỏ. Nếu là flavon, isoflavon, isoflavanon, flavanon, chalcon, leucoantocyanidin sẽ có màu vàng. Flavonol cho màu từ vàng đến cam. Auron cho màu đỏ đến đỏ tím.

2.2.4. Tác dụng với dung dịch 1% $AlCl_3$/ etanol

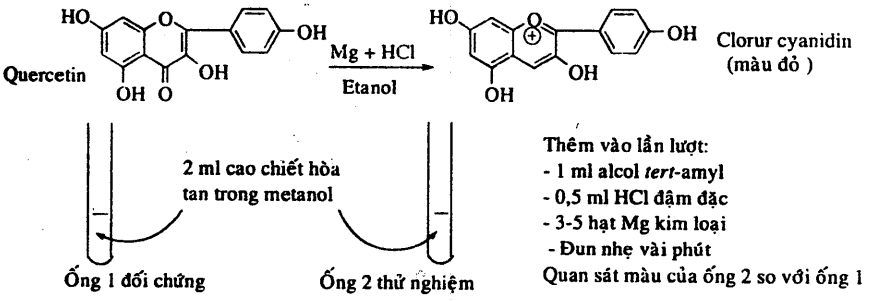
Tuỳ theo số lượng, vị trí của các nhóm hydroxy –OH, hợp chất flavonoid có màu khác nhau từ xanh lục đến xanh đen.

2.2.5. Tác dụng với dung dịch acetat chì (có tính kiềm) pha bão hòa trong nước

Phun xịt dung dịch lên bản mỏng, sấy bản 110°C trong 10 phút.

2.2.6. Phản ứng Cyanidin của Wilstatter (có tài liệu[8-10] gọi là phản ứng Shinoda)

Phản ứng khử bằng bột Mg trong HCl/etanol trên các dẫn xuất flavonoid.



Cách thực hiện như sau: Chuẩn bị hai ống nghiệm, cho vào mỗi ống 2ml cao chiết hòa tan trong metanol. Ống 1 làm đối chứng. Với ống số 2: cho thêm 1 ml alcol *tert*-butil hoặc alcol isoamyl; 0,5 ml HCl đậm đặc; 3-5 hạt magnesium kim loại. Đun nhẹ trong vài phút, sẽ xuất hiện màu ở lớp alcol phía trên.

Nếu cao chiết có chứa *flavon, flavanon, flavonol, flavanonol, xanthon* dung dịch trong ống 2 sẽ có màu cam, đỏ hoặc tím. Nếu cao chiết có chứa *isoflavon, isoflavanon, auron* dung dịch không đổi màu (kết quả âm tính).

Tài liệu[3] giải thích kết quả dương tính là do có chứa nhân γ-benzopyron, như phản ứng trình bày bên dưới; còn tài liệu[9] chỉ cho biết kết quả và không giải thích. Nhưng nếu cho rằng kết quả dương tính là do có chứa nhân γ-benzopyron sẽ không giải thích được cho các trường hợp của flavanon, flavanonol.

✳ Nếu sử dụng bột kẽm Zn thay thế cho bột Mg, thì chỉ có *flavanonol cho màu đỏ xậm*, còn flavonol và flavanon cho màu hồng nhạt hoặc không màu.

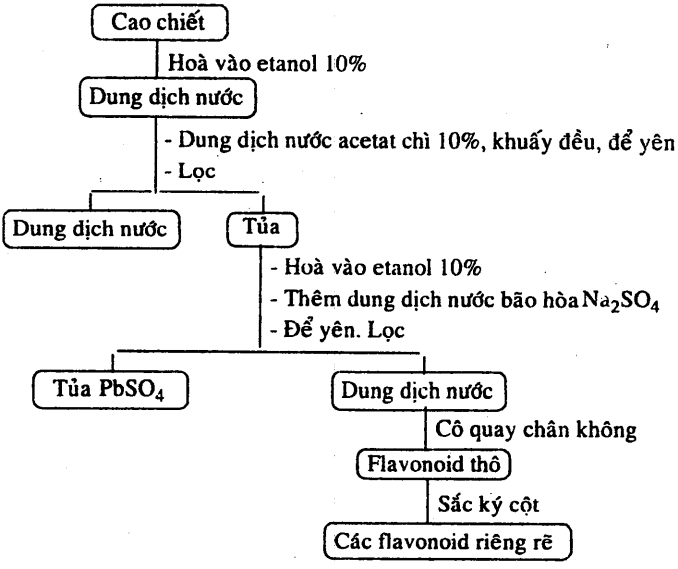
✳ Bryant[10] đã cải tiến phương pháp này để phân biệt flavonoid glycosid và flavonoid (aglycon) là sau khi thực hiện phản ứng Cyanidin, lấy riêng lớp màu và lắc với octanol. Nếu lớp màu từ lớp dưới chuyển hết lên lớp octanol ở trên, hợp chất thử là aglycon, nếu lớp màu vẫn nằm lại lớp dưới và lớp octanol không có màu, hợp chất thử là glycosid.

2.3. Phương pháp tách chiết flavonoid ra khỏi cây [9; 10]

Các flavonoid có độ hòa tan khác nhau tùy theo số nhóm hydroxy và các nhóm thế khác có trong cấu trúc hóa học, nên rất khó có một phương pháp chung để trích ly flavonoid ra khỏi cây. Flavonoid nào mang nhiều nhóm metoxy $-OCH_3$ và ít nhóm hydroxy -OH, có tính phân cực yếu, tan tốt trong dung môi ít phân cực như: benzen, cloroform, etyl acetate đôi khi tan một phần trong hexan. Flavonoid mang nhiều nhóm hydroxy, có tính phân cực mạnh sẽ hòa tan tốt trong dung môi có tính phân cực như aceton, etanol, metanol, butanol, nước...

Các flavonoid glycosid, antocyanidin không tan trong dietyl eter nhưng tan trong nước nóng, etanol nóng. Riêng antocyanidin, do khá bền với nhiệt độ nên có thể được chiết tách dưới dạng clorur bởi dung dịch 0,01 N HCl/ metanol.

Sơ đồ 4: Qui trình chiết tách flavonoid khỏi cây cỏ bằng dung dịch acetat chì



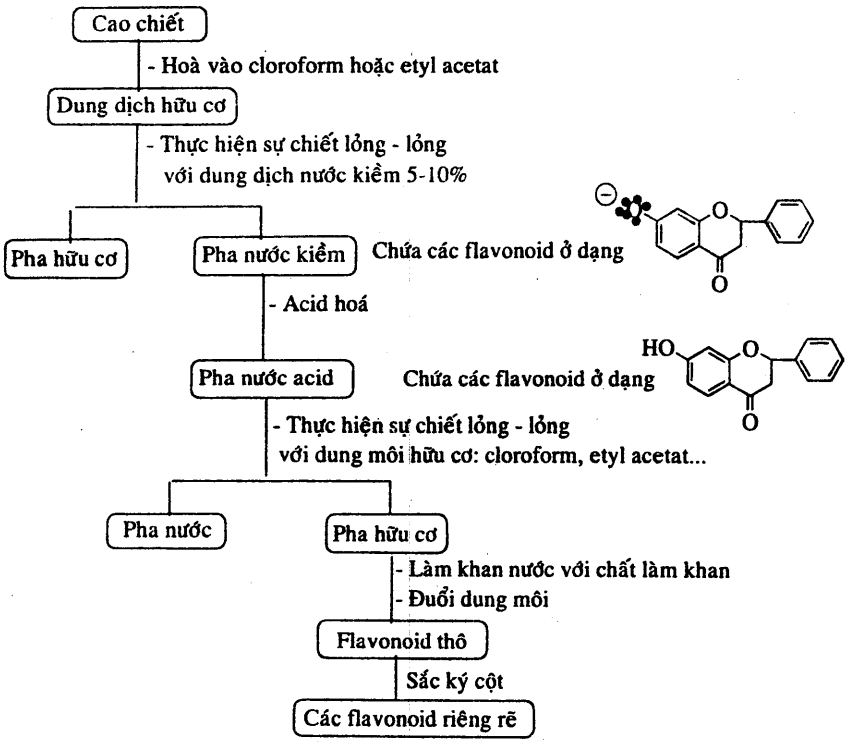
2.3.1. Tủa flavonoid bằng dung dịch acetat chì $(CH_3COO)_2Pb$

Qui trình được trình bày trong sơ đồ 4. Cao chiết được hòa tan vào dung dịch 10% etanol / nước chứa trong một erlen. Từ từ rót vào erlen này một dung dịch nước 10% acetat chì, khuấy nhẹ đều sẽ có tủa flavonoid. Lọc thu lấy tủa. Hoà tan tủa trở lại vào dung dịch alcol loãng, khuấy nhẹ cho thành một dung dịch treo đồng nhất. Rót thêm vào dung dịch nước bão hòa Na_2SO_4 nhằm loại bỏ tủa chì $PbSO_4$. Lọc lấy dung dịch nước trong, đuổi nước bằng cô quay chân không thu được cao thô chứa flavonoid toàn phần. Sắc ký cột để tách riêng các flavonoid.

2.3.2. Hấp thu flavonoid bằng than hoạt tính

Cho than hoạt tính vào dung dịch cao chiết nhằm hấp thu flavonoid. Lọc lấy than. Sử dụng lần lượt các dung môi hữu cơ từ phân cực yếu đến phân cực mạnh, thí dụ etyl eter, etyl acetate, metanol, nước nóng, phenol 7%... để chiết các flavonoid có tính phân cực khác nhau.

Sơ đồ 5: Qui trình chiết tách flavonoid khỏi cây cỏ bằng dung dịch kiềm



2.3.3. Tách phân đoạn các flavonoid bằng các dung dịch kiềm có độ kiềm khác nhau

Các flavonoid do có mang nhiều nhóm –OH phenol nên có thể tan được trong dung dịch kiềm. Dựa vào nguyên tắc này, sử dụng các dung dịch kiềm loãng hoặc nước vôi để chiết flavonoid ra khỏi cây cỏ, sau đó dung dịch chiết được acid hóa để trả flavonoid về dạng –OH tự do.

Thực hành: Hoà tan cao chiết vào dung môi hữu cơ thích hợp thí dụ cloroform, acetat etyl... Tiếp theo, thực hiện sự chiết lỏng–lỏng dung dịch này với dung dịch nước kiềm 5-10% như: dung dịch borat natri, $NaHCO_3$, Na_2CO_3... Các dung dịch nước kiềm được gộp chung lại, và được acid hóa. Sử dụng dung môi hữu cơ phù hợp để chiết tách các flavonoid ra khỏi dung dịch

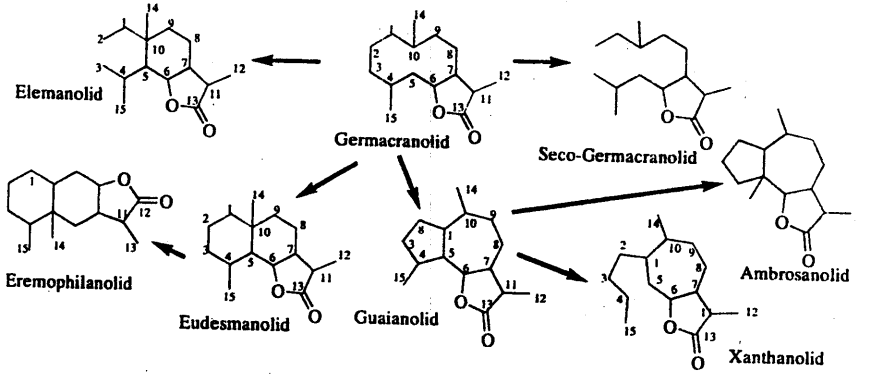
nước. Làm khan nước bằng $CaCl_2$, Na_2SO_4... Đuổi dung môi thu được cao thô chứa flavonoid toàn phần. Sắc ký cột để tách riêng các flavonoid.

Qui trình chiết tách flavonoid bằng dung dịch kiềm được trình bày trong sơ đồ 5.

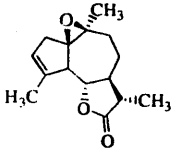
3. SESQUITERPEN LACTON

3.1. Đại cương [11]

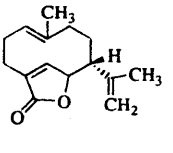
Sesquiterpen lacton là nhóm hợp chất đặc trưng hóa – thực vật của những cây thuộc họ Cúc (Asteraceae). Hơn 900 hợp chất sesquiterpen lacton đã được biết đến nay đều hiện diện trong các loài cây họ này và tập trung nhiều ở các tông (tribe): Eupatorieae, Vernonieae, Heliantheae, Helenieae, Astereae, Senecioneae, Anthemideae, Cynareae. Một số họ cây khác cũng có chứa sesquiterpen lacton nhưng ít hơn như họ Long Não (Lauraceae), Hoa tán (Umbelliferae), Ngọc Lan (Magnoliaceae).



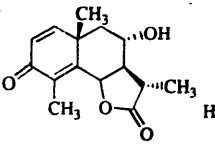
Về phân loại, sesquiterpen lacton được sắp xếp dựa trên cấu trúc khung cơ bản của sesquiterpen, với khoảng 20 dạng cấu trúc. Các dạng thường gặp nhất trong tự nhiên được sắp xếp theo số lượng giảm dần là: germacranolid, guaianolid, eudesmanolid, ambrosanolid, xanthanolid, elemanolid và eremophilanolid.



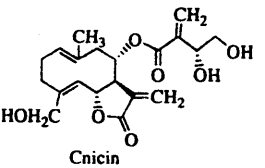
Arborescin
(*Artemisia arborescens*)



Aristolacton
(*Aristolochia reticulata*)



Artemisin
(*Artemisia arten*)



Cnicin
(*Cnicus benedictus*)

Sesquiterpen lacton được cô lập hầu như ở bộ phận lá, đầu hoa. Thường có vị đắng, không màu, có tính thân dầu, có một số hoạt tính sinh học đáng chú ý như kháng ung thư, kháng siêu vi, kháng khuẩn, kháng sốt rét (hợp chất artemisinin từ cây Thanh hao hoa vàng *Artemisia annua* L., hợp chất ambrosin từ cây *Ambrosia maritina* L. As.)

3.2. Các thuốc thử để định tính sự hiện diện của sesquiterpen lacton

Có nhiều phương pháp để phát hiện sesquiterpen lacton.

3.2.1. Khảo sát cao chiết thô bằng phổ hồng ngoại (IR)[12]

Có thể định tính sự hiện diện của sesquiterpen lacton ngay trên bột cây khô hoặc các loại cao chiết thô. Với bột cây khô có thể thực hiện như sau:

Bột cây xay nhuyễn (10 g) được chiết với metanol (4 x 20 ml), mỗi lần chiết 20 phút ở 45°C. Gộp các dung dịch metanol, đuổi dung môi còn khoảng 20 ml. Thêm vào 20 ml nước cất, cô cạn dung dịch này còn lại khoảng 20 ml. Nhỏ vào dung dịch này từng giọt dung dịch nước acetat chì 10% nhằm loại bỏ các tạp nhựa. Lọc bỏ tủa. Dung dịch nước lọc được chiết lỏng-lỏng với cloroform (3x 50 ml). Gộp dung dịch chloroform, làm khan với Na_2SO_4, đuổi dung môi, thu được cao chiết thô có chứa sesquiterpen lacton. Cao này được khảo sát hồng ngoại (IR, KBr). Nếu có sự hiện diện của sesquiterpen lacton sẽ có mũi hấp thu nhọn, mạnh của nhóm carbonyl lacton tại vùng 1780 - 1730 cm^{-1}.

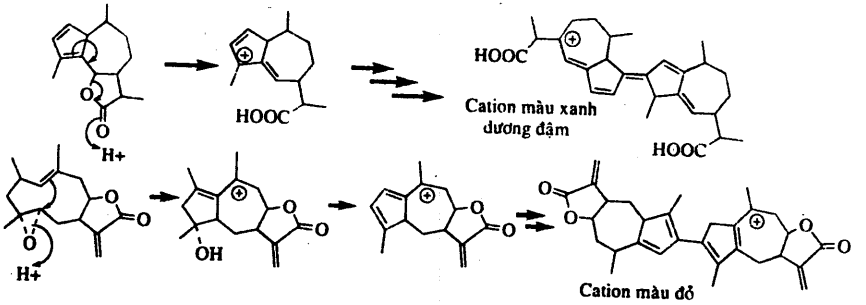
3.2.2. Sắc ký lớp mỏng và phun xịt bản bằng dung dịch H_2SO_4 đậm đặc[13]

Các hợp chất sesquiterpen lacton khi tác dụng với các acid mạnh (như acid sulfuric đậm đặc, đun nóng) bị dimer hóa để tạo thành cation với cấu trúc hóa học có nhiều nối đôi liên hợp. Cation với cấu trúc có 3-4 nối đôi liên

hợp sẽ có màu đỏ sậm (χ_{max} # 545 nm); cation có 4-5 nối đôi liên hợp sẽ có màu xanh dương đen (χ_{max} # 595 nm). Cấu trúc hóa học của các cation có màu được trình bày trong hình 1.

Loại guaianolid, xanthanolid, germacranolid do có thể đóng vòng tạo thành guaianolid nên cho màu xanh hoặc đỏ. Các loại ambrosanolid, eudesmanolid không cho phản ứng tạo màu (với thuốc thử trên chỉ cho xuất hiện vết màu đen).

Thực hành: Cao chiết được chấm sắc ký lớp mỏng, giải ly, phun xịt bản bằng dung dịch acid sulfuric đậm đặc. Sấy bản ở 105°C trong 5-10 phút cho đến khi xuất hiện vết màu đỏ đậm hoặc màu xanh dương đậm.



Hình 1: Sesquiterpen lacton tác dụng với H_2SO_4 đậm đặc, đun nóng, biến đổi thành cation có màu đỏ đậm hoặc xanh dương đậm [13]

3.2.3. Thử nghiệm với các thuốc thử đặc trưng[7].

Có thể thử bằng sắc ký lớp mỏng hoặc trong ống nghiệm (phải có ống đối chứng là ống chứa nước cất và không có chứa mẫu thử). Các loại thuốc thử sau đây cho kết quả dương tính với những hợp chất có chứa lacton bất bão hòa tại α, β hoặc với các glycosid tim (do có chứa vòng lacton).

a) Thuốc thử KEDDE: Đặc trưng để phát hiện lacton vòng 5.

Thuốc thử gồm hai dung dịch. Mỗi dung dịch được chứa riêng trong một chai

Dung dịch 1: Dung dịch 2% của acid 3,5-dinitrobenzoic trong metanol

Dung dịch 2: Dung dịch nước 5% KOH

* *Thử trong ống nghiệm*: Khi cần thử nghiệm, nhỏ mỗi dung dịch nói trên (2-3 giọt) vào 1 ml dung dịch chứa mẫu thử. Kết quả dương tính là sau 5 phút dung dịch chuyển thành ***màu đỏ tím***. Lưu ý: Hoà tan cao chiết trong alcol, không nên hòa trong aceton vì aceton cho màu xanh dương đậm với thuốc thử.

* *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: Phun xịt bản mỏng là dung dịch gồm acid 3,5-dinitrobenzoic (1 g) hòa vào hỗn hợp gồm metanol (50 ml) và dung dịch nước 2N KOH (50 ml).

b) Thuốc thử BALJET: Thuốc thử gồm hai dung dịch. Mỗi dung dịch được chứa riêng trong một chai

Dung dịch 1: Dung dịch 1% acid picric trong metanol

Dung dịch 2: Dung dịch nước 10% NaOH

* *Thử trong ống nghiệm*: Khi cần thử nghiệm, nhỏ mỗi dung dịch nói trên (2-3 giọt) vào 1 ml dung dịch chứa mẫu thử. Kết quả dương tính là sau 5 phút, dung dịch chuyển thành ***màu vàng cam đến đỏ đậm***.

c) Thuốc thử LEGAL: Thuốc thử gồm hai dung dịch. Mỗi dung dịch được chứa riêng trong một chai

Dung dịch 1: Dung dịch nước 0,5% natri nitroprussiat (dung dịch mới pha)

Dung dịch 2: Dung dịch nước 10% NaOH

* *Thử trong ống nghiệm*: Lấy 2 mg cao chiết, hòa tan vào 2 - 3 giọt pyridin, nhỏ thêm vào 1 giọt dung dịch 1 và 4 giọt dung dịch 2. Kết quả dương tính là sau 5 phút, dung dịch chuyển thành ***màu đỏ đậm*** (nếu là glycosid tim), thành ***màu hồng*** (nếu là lacton bất bão hòa tại α, β hoặc một vài α-lacton hoặc β-lacton)

* *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: Dung dịch phun xịt trên bản mỏng: natri nitroprussiat (1 g) hòa vào hỗn hợp gồm etanol (50 ml) và dung dịch nước 1N NaOH (50 ml), phun xịt lên bản mỏng, sấy nóng 5 phút, cho hiện vết màu đỏ tím.

d) Thuốc thử TOLLENS: Các hợp chất lacton bất bão hòa α, β hoặc β, γ đều khử được dung dịch Tollens (là hydroxid bạc trong nước ammoniac; $AgNO_3$ trong NH_4OH)

Thuốc thử gồm 2 dung dịch. Mỗi dung dịch được chứa riêng trong một chai

Dung dịch 1: Dung dịch nước 0,1N $AgNO_3$

Dung dịch 2: Dung dịch nước 5N NH_4OH

* *Thử trong ống nghiệm*: Lấy 2 ml cao chiết, hòa tan trong alcol, nhỏ thêm vào 5 giọt dung dịch 1 và 5 giọt dung dịch 2, lắc nhẹ vài giây rồi để yên, sẽ thấy lớp gương bạc bám lên thành trong của ống nghiệm. Nếu không thấy phản ứng ở nhiệt độ thường thì nhúng ống nghiệm vào nước nóng.

Đôi khi lớp gương bạc không hình thành vì ống nghiệm không sạch hoặc phản ứng chưa đủ, nhưng cho dù thế nào cũng có Ag kim loại bạc màu đen kết tủa dưới đáy ống nghiệm (đôi khi do hợp chất có hàm lượng thấp trong cao chiết, nên phải để qua đêm, sáng hôm sau mới thấy kết quả)

* *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: Dung dịch phun xịt trên bản mỏng: Hỗn hợp hai loại thuốc thử theo tỉ lệ (1:1), phun xịt lên bản mỏng, sấy bản ở 105°C trong 5-10 phút cho đến khi xuất hiện vết màu đen.

e) Thuốc thử HYDROXYLAMIN-$FeCl_3$: Để phát hiện lacton, amid, anhidrid carboxylic.

* *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: Pha thuốc thử để phun xịt bản mỏng

Thuốc thử gồm hai dung dịch. Mỗi dung dịch được chứa riêng trong một chai. Khi muốn hiện hình vết trên bản mỏng: phun xịt bản với dung dịch 1, để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng rồi phun tiếp dung dịch 2, sấy khô sẽ cho hiện vết có màu đỏ tím.

Dung dịch 1:

* (a) Hydroxylamin (10g), nước cất (25 ml), cho vào bình định mức 100 ml, thêm etanol cho đủ 100 ml, giữ dung dịch nơi thoáng mát.

* (b): KOH (10g) trong một lượng tối thiểu nước cất, rồi thêm etanol cho đủ 100 ml.

* Lấy dung dịch a (1 thể tích), dung dịch b (2 thể tích) trộn chung lại, lọc bỏ tủa nếu có, giữ trong tủ lạnh lâu được 2 tuần.

Dung dịch 2:

Hoà tan $FeCl_3$, $6H_2O$ (10 g) trong 20 ml HCl 36%. Rót dung dịch này vào một bình có sẵn 200 ml dietyl eter, lắc bình để có được dung dịch đồng nhất. Dung dịch đậy nắp kín có thể giữ được rất lâu.

3.3. Phương pháp tách chiết sesquiterpen lacton ra khỏi cây

Các sesquiterpen lacton nói chung có tính phân cực trung bình, tan tốt trong cloroform, dietyl eter; tuy nhiên cũng có những sesquiterpen lacton tan trong eter dầu hỏa hoặc tan trong metanol là tùy thuộc vào việc phân tử có mang thêm những nhóm chức khác. Không có một qui trình chuẩn nào để chỉ tách chiết riêng sesquiterpen lacton ra khỏi cây cỏ.

Bột cây khô được chiết bằng eter dầu hỏa để loại béo. Cao eter dầu hỏa này cần được kiểm tra bằng những phương pháp nêu trên để xem có chứa sesquiterpen lacton hay không. Tiếp theo, bột cây được chiết với cloroform, đuổi dung môi thu được cao cloroform có chứa sesquiterpen lacton. Tinh chế để tách riêng các sesquiterpen lacton.

4. TERPENOID - STEROID

4.1. Đại cương về terpenoid [3, 14, 15]

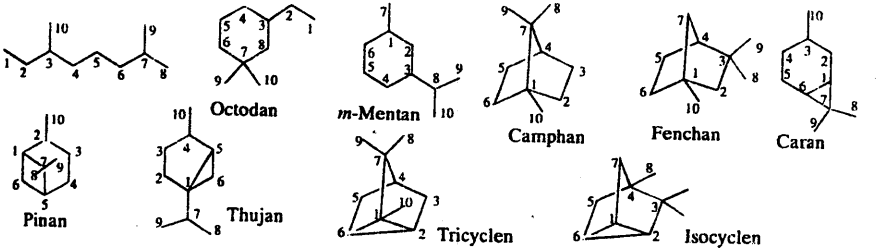
Terpenoid là nhóm hợp chất tự nhiên mà cấu trúc hóa học dựa trên cơ sở các phân tử isopren liên kết lại với nhau, có công thức tổng quát $(C_5H_8)_n$ với $n \geq 2$. Tuy là dẫn xuất của isopren nhưng isopren lại không phải là tiền chất của quá trình sinh tổng hợp terpenoid. Chất liệu cơ bản để sinh tổng hợp terpenoid là pharnesyl pyrophosphat.

Dựa vào số đơn vị isopren, người ta phân chia như sau

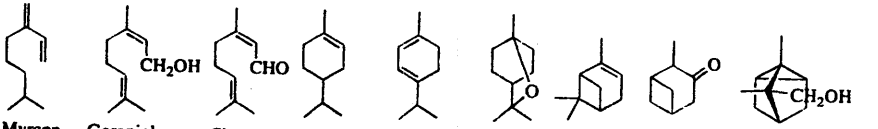
4.1.1. Monoterpen ($C_{10}H_{16}$)

Là thành phần chủ yếu của tinh dầu, hiện diện trong khoảng 60 họ thực vật, nhưng chủ yếu trong 10 họ. Hàm lượng tinh dầu trong cây thường thấp, khoảng 1%, ngoại trừ nụ hoa cây Đinh hương *Syzygium aromaticum* (L.) có hàm lượng tinh dầu chiếm 15-20 %, trong đó thành phần chính là eugenol.

Cấu trúc hóa học của các monoterpen có thể là mạch hở, 1, 2 hoặc 3 vòng với khoảng 10 khung sườn carbon cơ bản chính (có tên gọi riêng cho khung) và nhiều khung biến đổi do sự chuyển vị các nhánh[16]. Một số khung sườn monoterpen và qui ước đánh số thứ tự các carbon trong khung được trình bày trong hình 2. Một số hợp chất tự nhiên loại monoterpen được trình bày trong hình 3.



Hình 2: Một số khung monoterpen và cách đánh số khung theo qui ước quốc tế



Myrcen (*Houblon*) Geraniol (*Citronelle*) Citral (*Verveine*) Limonen (*Citron*) a-Terpinen (*Pin*) Cineol (*Eucalyptus*) Pinen (*Pin*) Campho (*Camphrier*) Teresantalol (*Santal*)

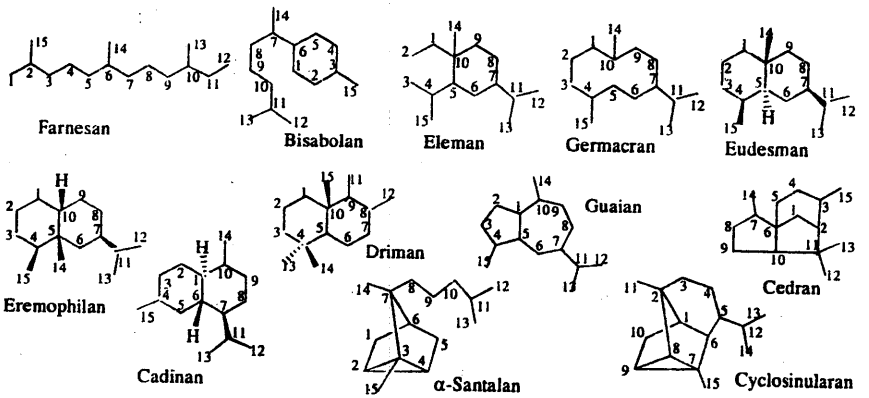
Hình 3: Một số hợp chất tự nhiên loại monoterpen

4.1.2. Sesquiterpen ($C_{15}H_{24}$)

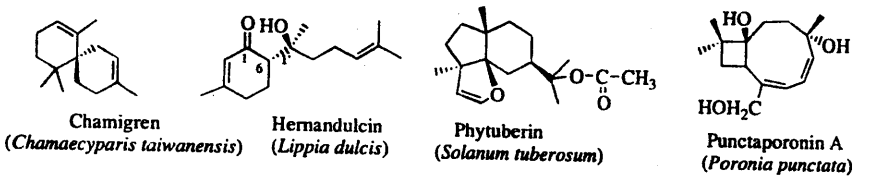
Tinh dầu cũng chứa những hợp chất loại sesquiterpen. Thường gặp các sesquiterpen lacton trong các cây họ Cúc.

Cấu trúc hóa học của các hợp chất tự nhiên sesquiterpen có thể là mạch hở, 1, 2, 3 hoặc 4 vòng với 80 khung sườn carbon cơ bản chính[16].

Một số khung sườn sesquiterpen và qui ước đánh số thứ tự các carbon trong khung được trình bày trong hình 4. Một số hợp chất tự nhiên loại sesquiterpen được trình bày trong hình 5.



Hình 4: Một số khung sườn sesquiterpen và qui ước đánh số khung sườn carbon

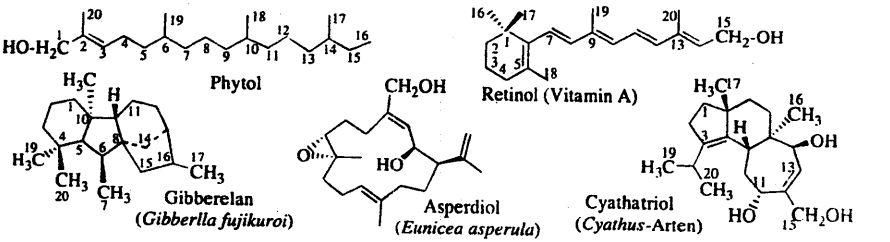


Hình 5: Một số hợp chất tự nhiên loại sesquiterpen

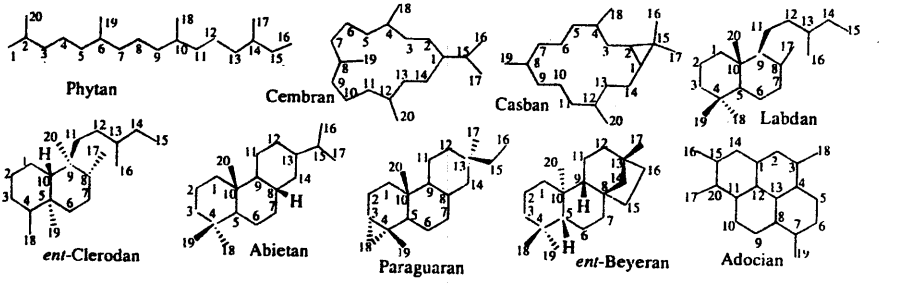
4.1.3. Diterpen ($C_{20}H_{32}$)

Trong tự nhiên, diterpen không vòng là hợp chất phytol. Diterpen đơn vòng là vitamin A. Diterpen bốn vòng có khung cơ bản là gibberelan với thí dụ là gibberilin, chất tăng trưởng thực vật. Một số hợp chất tự nhiên loại diterpen được trình bày trong hình 6.

Cấu trúc hóa học của các diterpen có thể là mạch hở, 1, 2, 3 hoặc 4 vòng với 70 khung sườn carbon cơ bản chính[16]. Một số hợp chất tự nhiên có khung sườn diterpen và qui ước đánh số thứ tự các carbon được trình bày trong hình 7.



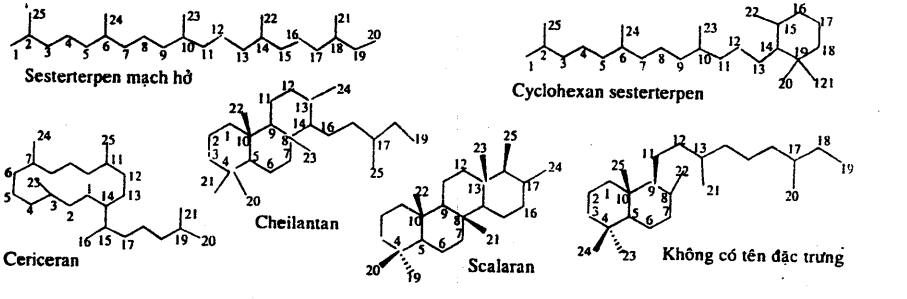
Hình 6: Một số hợp chất tự nhiên thuộc loại diterpen



Hình 7: Một số khung sườn cơ bản loại diterpen và cách đánh số carbon

4.1.4. Sesterterpen ($C_{25}H_{40}$)

Trong tự nhiên, các hợp chất loại sesterterpen hiện diện với số lượng nhỏ. Cấu trúc hóa học của các sesterterpen có thể là mạch hở, 1, 2, 3 hoặc 4 vòng với 6 khung sườn carbon cơ bản chính[16]. Một số khung sườn sesterterpen và qui ước đánh số thứ tự các carbon được trình bày trong hình 8.

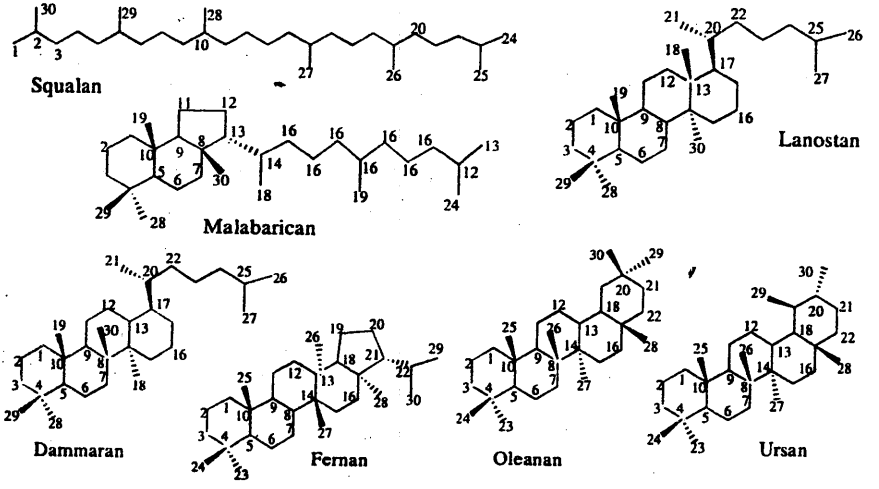


Hình 8: Một số khung sườn cơ bản loại sesterterpen

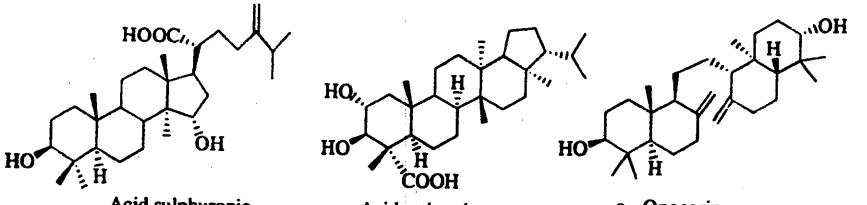
4.1.5. Triterpen ($C_{30}H_{48}$)

Triterpen được phân bố rộng rãi trong giới động vật và thực vật, hiện diện ở dạng tự do hoặc glycosid.

Cấu trúc hóa học của các triterpen có thể là mạch hở, 3, 4 hoặc 5 vòng với 33 khung sườn carbon cơ bản chính[16]. Một số khung sườn triterpen và qui ước đánh số thứ tự các carbon được trình bày trong hình 9.



Hình 9: Một số khung sườn triterpen và cách đánh số carbon



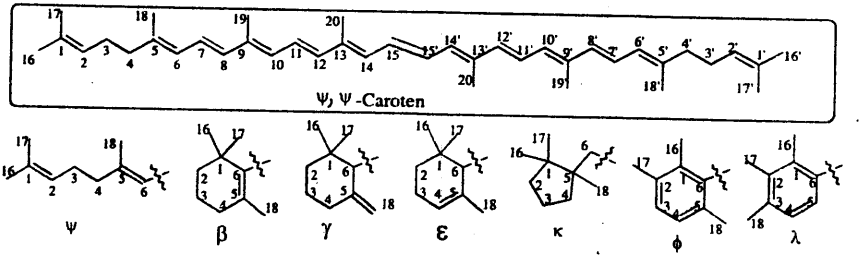
Hình 10: Một số hợp chất tự nhiên loại triterpen

4.1.6. Tetraterpen ($C_{40}H_{64}$)

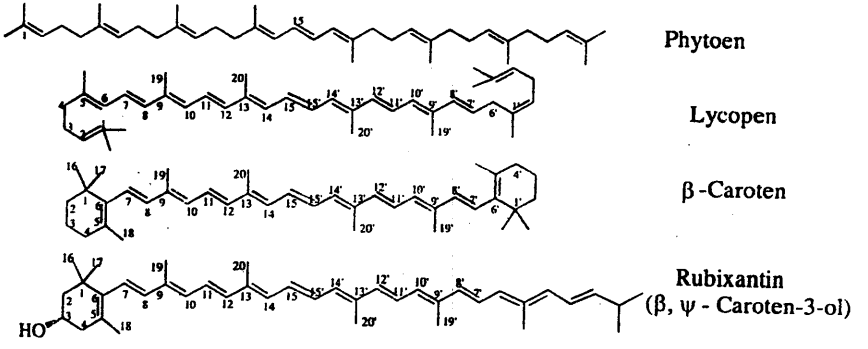
Tetraterpen còn được gọi là carotenoid. Các hợp chất này thường có cấu trúc hóa học gồm hệ thống các nối đôi liên hợp, nên hợp chất có màu từ vàng, cam đến đỏ (tùy vào số nối đôi) tạo nên màu sắc cho hoa và trái cây.

Cấu trúc hóa học của các tetraterpen có thể là mạch hở, 1 hoặc 2 vòng[15, 16]. Danh pháp các caroten gồm hai phần: tên chính là caroten (là phần mạch thẳng, mạch chính, stem name), tên này có tiếp đầu ngữ là hai mẫu tự Hy Lạp để cho biết cấu trúc hóa học của hai nhóm thế gắn ở hai đầu mạch chính. Cách đánh số hệ thống mạch thẳng và hai nhóm cuối mạch như trình bày trong hình 11.

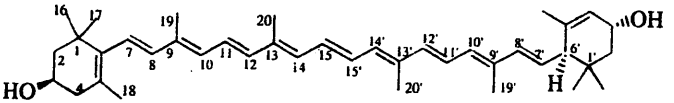
Một số hợp chất tetraterpen tự nhiên được trình bày trong hình 12.



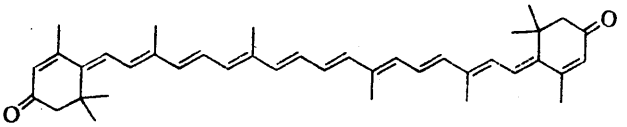
Hình 11: Tên gọi và cách đánh số các tetraterpen



Hình 12: Cấu trúc hóa học một số hợp chất tự nhiên loại tetraterpen



Lutein

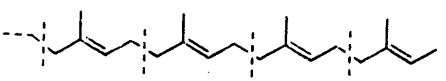


Rhodoxantin

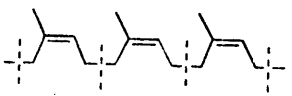
4.1.7. Polyterpen $(C_5H_8)_n$

Các polyterpen luôn có cấu trúc mạch hở, thẳng. Các polyterpen tự nhiên với độ polymer hóa cao (từ 500 đến 5000 đơn vị isopren) là những hợp chất nhựa cây hiện diện trong khoảng 300 loài thực vật. Các nối đôi của các hợp chất tự nhiên polyterpen hiện diện hoặc tất cả ở cấu hình *E* hoặc tất cả ở cấu hình *Z*.

Polyterpen tự nhiên được khai thác nhiều nhất là hợp chất caoutchouc từ nhựa của cây cao su *Hevea brasiliensis* (A. Juss) Muell, họ Thầu dầu (Euphorbiaceae), kế đến là hợp chất gutapercha từ cây *Palaquium gutta*, từ nhựa này người ta đã chế biến thành kẹo cao su (chewing-gum).



Gutapercha
(*Palaquium gutta*, Sapotaceae)
Các nối đôi C=C có cấu hình *E*



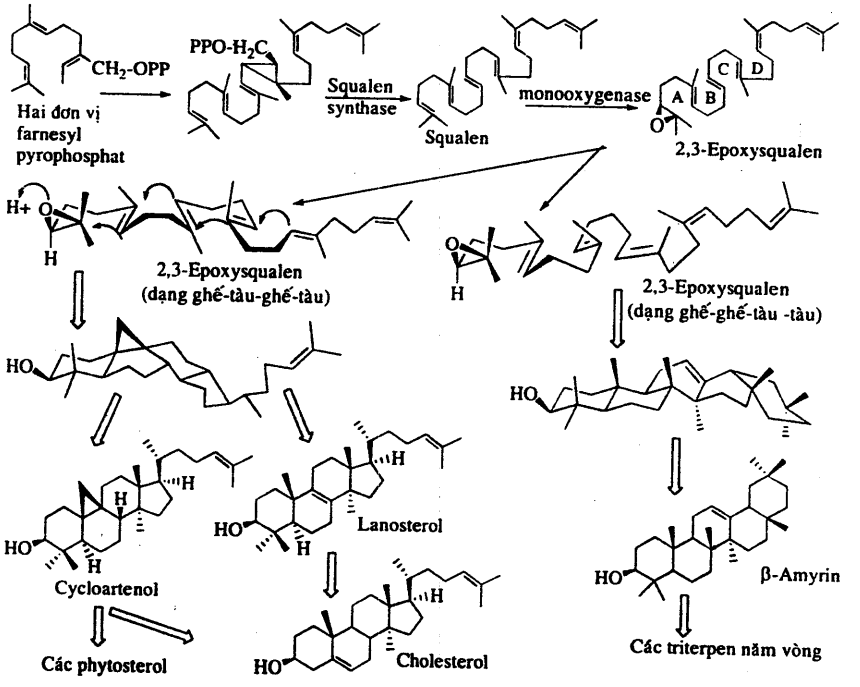
Caoutchouc
(*Hevea brasiliensis*)
Các nối đôi C=C có cấu hình *Z*

4.1.8. Steroid

Steroid là nhóm hợp chất tự nhiên phân bố rộng rãi trong giới động vật và thực vật, với cấu trúc tổng quát là hệ thống vòng cyclopentanoperhydrophenantren hoặc trong một vài trường hợp hiếm gặp là dạng biến đổi của hệ thống vòng nói trên.

Steroid có nguồn gốc sinh tổng hợp giống như triterpen với chất liệu cơ bản là pharnesyl pyrophosphat.

Quá trình sinh tổng hợp để tạo thành các steroid hoặc các triterpen năm vòng được trình bày trong hình 13[3, 15]. Giai đoạn đầu tiên của sự sinh tổng hợp là do enzym monooxygenase oxid hoá hợp chất squalen tạo thành 2,3-epoxysqualen, tiếp theo là sự đóng vòng. Tùy theo việc các phân tử squalen gấp khúc, xếp nếp, với cấu hình trong không gian theo kiểu dạng ghế hoặc dạng tàu mà sau khi đóng vòng, sẽ tạo ra sản phẩm có hình dạng khác nhau. Khi phân tử squalen gấp khúc để bố trí các vòng ABCD theo kiểu *ghế-tàu-ghế-tàu* sẽ tạo cycloartenol, từ đó có thể biến đổi thành phytosterol và các dẫn xuất steroid. Còn khi phân tử squalen gấp khúc các vòng ABCD theo kiểu *ghế-ghế-tàu-tàu* sẽ tạo ra triterpen năm vòng.



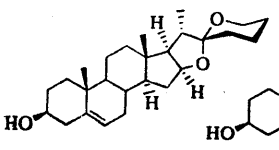
Hình 13: Sự sinh tổng hợp tạo thành phytosterol hoặc triterpen năm vòng

Các phytosterol là đặc trưng của giới thực vật. Ở giới động vật, "sự đóng vòng" theo kiểu khác để tạo thành lanosterol rồi thành cholesterol.

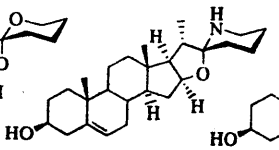
Trong quá trình sinh tổng hợp các phytosterol, còn có thêm sự hydrogen hóa một phần, sự tạo ra thêm các nhóm chức alcol, sự mất đi ba nhóm metyl (giai đoạn chung của tất cả các sterol), "sự alkyl hóa" để gắn thêm vào nhánh hở ở cuối mạch, tại carbon C-24, một nhánh nhỏ metyl hoặc etyl. Nhánh nhỏ này giúp phân biệt các phytosterol với các sterol động vật. Ở các loại nấm, "sự đóng vòng" theo kiểu để tạo thành lanosterol. Tuy nhiên, thí dụ như ergosterol, cũng được alkyl hóa tại C-24 giống như phytosterol nhưng vẫn giữ khung sườn của lanosterol.

Các phytosterol được gặp nhiều nhất trong tự nhiên là stigmasterol, các β- và γ-sitosterol

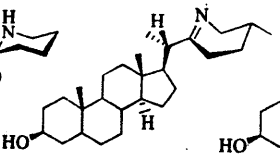
Trong giới thực vật, có loại phytosterol mang thêm những vòng phụ: các sapogenin steroid của họ Khoai ngọt (Dioscoreaceae), các alcaloid steroid trong họ Cà (Solanaceae), phần genin trợ tim của họ Hoa mõm chó (Scrophulariaceae).



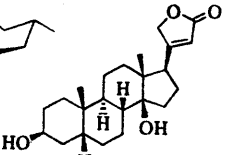
Diosgenin
(Dioscoreaceae)



Solasodin
(Solanaceae)



Solacongestidin
(Solanaceae)



Digitoxigenin
(Scrophulariaceae)

4.2. Các thuốc thử đặc trưng để định tính terpenoid - steroid

Có thể thử bằng sắc ký lớp mỏng hoặc trong ống nghiệm (phải có ống đối chứng là ống chứa nước cất, không có chứa mẫu thử và chứa thuốc thử).

4.2.1. Phản ứng Liebermann-Burchard để phát hiện *steroid - triterpenoid*

✱ *Thử trong ống nghiệm*: Anhidrid acetic (1 ml), cloroform (1 ml), làm lạnh ống nghiệm rồi thêm 1 giọt H_2SO_4 đậm đặc. Cho mẫu vào ở dạng rắn hoặc pha trong cloroform. Phản ứng dương tính là dung dịch đổi thành màu xanh dương, lục, cam hoặc đỏ; màu này bền không đổi.

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: Trộn cẩn thận anhidrid acetic (5 ml) và H_2SO_4 đậm đặc (5 ml), để nguội và thêm vào metanol (50 ml) là dung dịch để phun xịt bản mỏng, sấy bản ở 110°C trong 5-10 phút. Steroid cho màu xanh dương –lục, triterpenoid cho màu đỏ.

4.2.2. Phản ứng Rosenheim để phát hiện *steroid - triterpenoid*

✱ *Thử trong ống nghiệm*: Dung dịch mẫu thử (1 ml), acid tricloroacetic (2 giọt). Phản ứng dương tính là sau 20 phút dung dịch đổi thành màu xanh dương, có ***saponin triterpen***

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: Hoà tan acid tricloroacetic (25 g) trong cloroform (100 ml) là dung dịch để phun xịt bản mỏng, sấy bản ở 100°C trong 5-10 phút, nhìn bản dưới đèn UV.

4.2.3. Phản ứng Rosenthaler để phát hiện *steroid - triterpenoid*

✱ *Thử trong ống nghiệm*: Dung dịch mẫu thử (1 ml), dung dịch 1% vanilin trong etanol (2 giọt), HCl đậm đặc (1 giọt). Phản ứng dương tính là dung dịch đổi thành màu xanh lục hoặc tím.

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: Hoà tan vanilin (1 g) trong dung dịch nước 50% acid ortophosphoric (100 ml) là dung dịch để phun xịt bản mỏng, sấy bản ở 110°C trong 10-20 phút đến khi hiện vết có màu vàng.

4.2.4. Phản ứng Salkowski để phát hiện *steroid*[19]

✱ *Thử trong ống nghiệm*: Hoà tan mẫu thử (1-2 mg) trong cloroform (1 ml) và nhỏ thêm vào H_2SO_4 đậm đặc (1 ml). Phản ứng dương tính là dung dịch đổi thành màu đỏ đậm, xanh, xanh-tím.

4.2.5. Phản ứng Noller để phát hiện *steroid - triterpenoid*

✱ *Thử trong ống nghiệm*: Dung dịch mẫu thử (1 ml), $SnCl_4$ (2-4 giọt) nếu có màu đặc trưng, bền, khi so với ống chứng là dương tính.

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: cloroform (20 ml), acid acetic băng (20 ml), $SnCl_4$ (3 ml) là dung dịch để phun xịt bản mỏng. Sấy bản ở 110°C trong 5-10 phút đến khi hiện vết.

4.2.6. Phản ứng Carr-Price để phát hiện *steroid - triterpenoid*

✱ *Thử trong ống nghiệm*: Dung dịch mẫu thử (1 ml), dung dịch 20% $SnCl_3$ trong cloroform (1-2 giọt) nếu có màu đặc trưng, bền, khi so với ống chứng là dương tính.

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: $SnCl_3$ (1 g) hoà tan trong acid acetic băng (1 ml) là dung dịch để phun xịt bản mỏng. Sấy bản ở 100°C trong 5-10 phút đến khi hiện vết, steroid cho màu vàng, triterpen cho màu xanh lục.

4.2.7. Thuốc thử pentaclorur antimon $SbCl_5$ để phát hiện *terpen*

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: Dung dịch $SbCl_5$ (2 phần theo trọng lượng), CCl_4 (8 phần) là dung dịch để phun xịt bản mỏng. Sấy bản ở 120°C trong 5-10 phút đến khi hiện vết.

4.2.8. Thuốc thử anisaldehyd - acid sulfuric để phát hiện *dẫn xuất của terpen*

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: anisaldehyd (0,5 ml), acid acetic băng (10 ml), metanol (85 ml), H_2SO_4 đậm đặc (5 ml) là dung dịch để phun xịt bản mỏng. Sấy bản ở 110°C trong 5-10 phút đến khi hiện vết màu tím, xanh dương, lục, đỏ, xám trên nền bản mỏng màu hồng.

4.2.9. Thuốc thử Komarowsky: để phát hiện *steroid*

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: Dung dịch 2% của 4-hydroxybenzaldehyd pha trong metanol (10 thể tích), dung dịch 50% H_2SO_4 (1 thể tích) là dung dịch để phun xịt bản mỏng. Sấy bản ở 105°C trong 5 phút đến khi hiện vết màu vàng đến hồng.

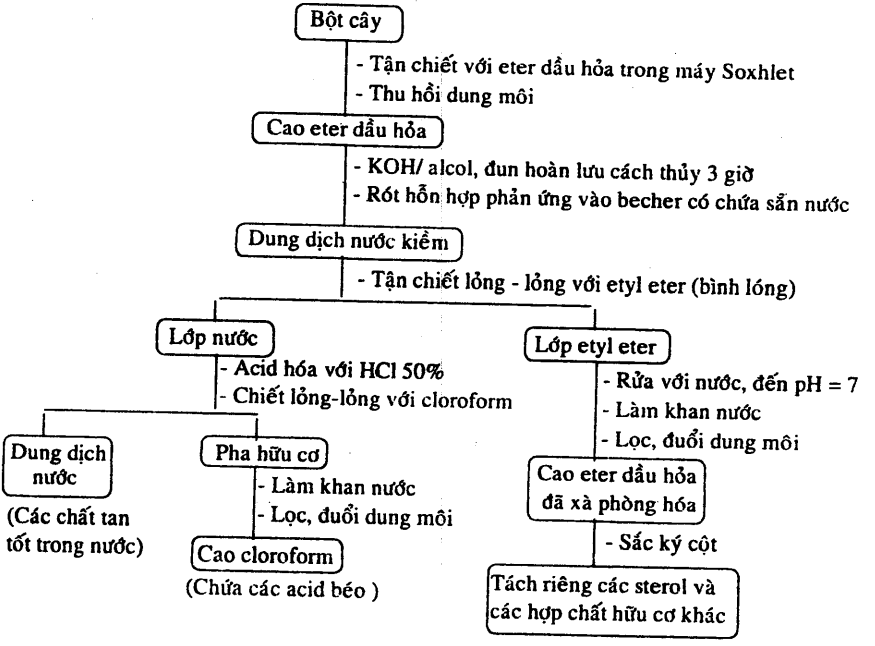
4.3. Các phương pháp chiết tách terpenoid – steroid ra khỏi cây

Hầu hết các terpenoid, steroid là hydrocarbon có mang một số nhóm chức như hydroxy (-OH), acetyl (-OAc), eter (-O-), carbonyl (C=O ester hoặc acid carboxylic), nối đôi (-C=C-)... nên nói chung là những hợp chất có tính ít phân cực, có tính thân dầu nên tan tốt trong eter dầu hỏa, hexan, eter dietyl, cloroform... ít tan trong nước ngoại trừ khi chúng kết hợp với các phân tử đường để tạo thành glycosid.

Không có phương pháp đặc trưng nào để chỉ tách chiết riêng terpenoid-steroid ra khỏi bột cây. Sử dụng các dung môi hữu cơ nêu trên để chiết tách chúng ra khỏi cây cỏ và tiếp theo sử dụng các kỹ thuật sắc ký cột để tách riêng các hợp chất.

Muốn chiết tách glycosid terpenoid hoặc glycosid steroid ra khỏi bột cây: sử dụng metanol hoặc etanol, sau khi đã loại béo bột cây.

Sơ đồ 4: Qui trình tách chiết riêng các sterol, triterpen ra khỏi cao eter dầu hỏa chứa nhiều chất béo

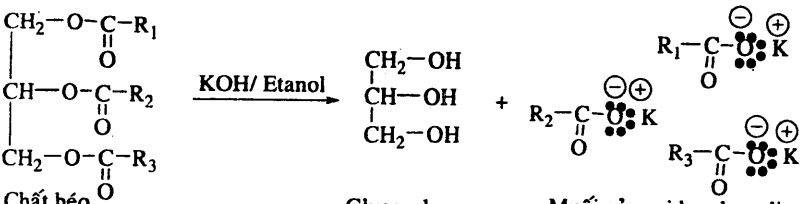


Các sterol thường kết hợp với lipid, caroten, lecitin. Tuy nhiên, dù sterol hiện diện ở trạng thái tự do, do các sterol hòa tan tốt trong dung môi eter dầu hỏa, nên sterol sẽ ở chung trong cao chiết này. Muốn loại bỏ các chất béo, tách riêng sterol ra khỏi cao eter dầu hỏa có thể thực hiện việc xà phòng hóa trình bày trong sơ đồ 4.

Thực hành việc điều chế cao eter dầu hỏa đã xà phòng hóa.

Trong một erlen hoặc bình cầu, cho vào cao eter dầu hỏa (1 α g), NaOH hoặc KOH rắn (0,9 α g), metanol hoặc etanol 95° (6 α ml). Hỗn hợp được đun hồan lưu cách thủy trong 3 giờ. Rót hỗn hợp này vào một becher có chứa sẵn 5-10 α ml nước, sẽ có dung dịch nước. Dung dịch này được chiết lỏng –lỏng nhiều lần với dietyl eter (phải kiểm tra để xem đã chiết kiệt chưa). Gộp các dung dịch dietyl eter . Rửa dung dịch dietyl eter với nước cất nhiều lần cho đến khi có pH = 7. Dung dịch dietyl eter được làm khan nước với Na_2SO_4. Đuổi dung môi sẽ thu được cao eter dầu hỏa đã xà phòng hóa, chứa các sterol. Sắc ký cột để tách riêng từng sterol.

Phản ứng xà phòng hóa để cắt đứt triglycerid nhằm loại bỏ các chất béo



Chất béo (Triglycerid) | Glycerol (Tan trong nước) | Muối của acid carboxylic (Tan tốt trong nước)

Sau khi chiết eter dầu hỏa xong, dung dịch nước còn lại (có chứa các muối RCOOK) được acid hóa bằng HCl 50% và được chiết lỏng – lỏng với cloroform để chiết các acid béo RCOOH. Gộp dung dịch cloroform, làm khan nước và đuổi dung môi thu được cao cloroform chứa các acid béo. Hỗn hợp này được ester hóa và phân tích thành phần, hàm lượng, các ester béo bằng kỹ thuật GC-MS (Xem phần lipid).

Chú ý: Chỉ thực hiện việc xà phòng hóa trên cao eter dầu hỏa khi khảo sát bằng sắc ký lớp mỏng thấy cao cho xuất hiện vệt kéo dài từ mức xuất phát đến mức tiền tiến dung môi trên tấm bản mỏng. Còn nếu sắc ký lớp mỏng cho các vết rõ ràng thì nên thực hiện sắc ký cột ngay trên cao này, bởi vì sự xà phòng hóa sẽ cắt đứt luôn các nối ester sterol (hoặc các nối amid của các hợp chất alcamid, hoặc nối ester của các sesquiterpen lacton...), đưa đến việc cô lập được các

hợp chất không đúng với trạng thái nguyên thủy của hợp chất hiện diện trong cây.

5. CHẤT BÉO

5.1. Đại cương về chất béo [17, 18]

Chất béo là những hợp chất hữu cơ thu được khi chiết mô, tế bào bởi những dung môi không phân cực. Người ta thường chia chất béo thành các nhóm: sterol (không chứa nối ester, không bị thủy giải), nhóm sáp, nhóm glycerid, dầu béo, nhóm chất béo phức tạp (phospholipid, lipoprotein...).

Lipid có liên quan đến nhiều chức năng sinh học của thực vật, động vật, vi sinh vật. Lipid là nguyên liệu dự trữ năng lượng. Trong động vật hữu nhũ và loài chim, lipid dự trữ trong các mô mỡ và hiện diện chủ yếu ở dạng triacylglycerol cùng với một lượng ít acid béo tự do và hỗn hợp glycerid. Ở trong con cá mập, cá đuối, lipid hiện diện chủ yếu ở dạng triacylglycerol và squalen. Trong loài cá có nhiều xương, lipd hiện diện ở gan, bắp thịt, tủy xương.

5.1.1. Sáp

Lá cây và vỏ trái cây (loại trái cây có vỏ trơn láng) được che phủ bên ngoài bởi một lớp bảo vệ mềm mại, không thấm nước. Lớp bề mặt này chắc chắn, trơn láng, liên tục, hơi ẩm ướt. Các loại khí, hơi nước có thể đi xuyên ngang qua, thấm được vào bên trong của lá cây ít hay nhiều là tùy vào lớp màng che phủ này dầy hay thưa. Không có màng che chở này cây cỏ sẽ nhanh chóng bị khô héo dưới ánh sáng mặt trời.

Lớp màng này được tạo thành bởi cutin và sáp.

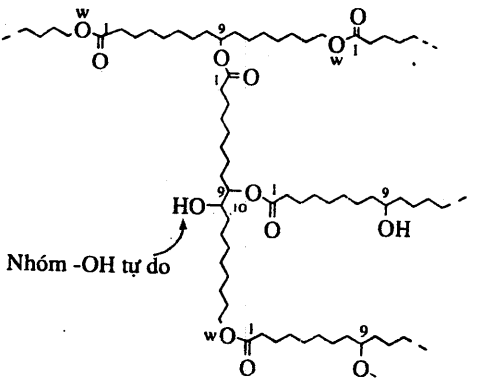
* ***Lớp cutin*** được tạo nên do các phân tử hydroxyacid bị ester hóa-liên phân tử: một nhóm chức –COOH của một phân tử tạo nối ester với nhóm chức alcol của một phân tử khác, tạo nên một mạng, như trình bày trong hình 14.

Các acid dây dài C_{16} và C_{18} như acid palmitic, steric, oleic rất thường bị các enzym monooxygenase oxid hóa tại nối đôi C=C tạo thành epoxy và tiếp theo là sự hydrat hóa tạo thành hai nhóm hydroxy tại C_9 và C_{10}, từ đó có các

hydroxyacid (nhóm hydroxy tại carbon cuối mạch được gọi là vị trí ω). Các phân tử hydroxyacid bị ester hóa-liên phân tử tạo nên một hệ thống mạng ngang (hai chiều). Trong hệ thống mạng hai chiều, một trong hai nhóm alcol thường ở dạng tự do, nhưng chính nhóm chức –OH này sẽ tiếp tục sự ester hóa liên phân tử để tạo nên mạng ba chiều.

Lớp cutin tạo thành do sự polymer hóa từ những thành phần của chất béo. nhờ sự polymer hóa mà cutin không tan trong những dung môi của chất béo; nhờ vào các nhóm chức –OH tự do nên lớp cutin cũng có được phần nào tính ưa nước.

Khi cây cỏ ở trong điều kiện ẩm ướt, hệ thống màng cutin sẽ lơi lỏng hơn để phân tán bớt nước trong quá trình hô hấp và trong điều kiện khô hạn, hệ thống màng cutin sẽ tự co chặt lại giúp cây khỏi bị mất nước.



Hình 14: Lớp cutin của lá cây là lớp mạng che phủ bên ngoài của lá cây, được tạo thành do sự ester hóa liên phân tử giữa các hợp chất hydroxyacid

Bảng 1: Công thức hoá học của một số acid béo thường gặp.

Tên acid béo	Ký hiệu	Loài thực vật
Caprilic	8:0	cây Cọ, Họ Cau (Arecaeae)
Capric	10:0	
Lauric	12:0	Lauraceae
Myristic	14:0	Quả Nhục đậu khấu (Myristicaceae)

Palmitic	16:0	Trong hầu hết các loại dầu béo
Palmitoleic	16:1 Δ_{9Z}	Rất thông dụng, hàm lượng nhỏ
Stearic	18:0	Trong nhiều loại dầu béo, hàm lượng nhỏ
Ricinoleic	18:1-OH Δ_{9Z}	Dầu thầu dầu
Oleic	18:1 Δ_{9Z}	Trong hầu hết các loại dầu béo
Linoleic	18:2 $\Delta_{9, 12Z}$	Rất thông dụng,
α-Linoleic	18:3 $\Delta_{9, 12, 15Z}$	Hàm lượng nhỏ
γ-Linoleic	18:3 $\Delta_{6, 9, 12Z}$	Dầu lanh *Linum usitatissimum*
Parinaric	18:4 $\Delta_{9,11,13,15Z}$	*Parinarium laurinium*
Eleosteric	18:3 $\Delta_{9Z, 11E, 13E}$	Dầu của cây cho gỗ ở Trung Quốc
Arachidic	20:0	Dầu phọng
Arachidonic	20:3 $\Delta_{8,11,14Z}$	
Linolenic	20:4 $\Delta_{5, 8,11,14Z}$	
Eicosapentaenoic	20:5 $\Delta_{5, 8,11,14,17 Z}$	Một loại dầu cá
Behenic	22:0	Fabal
Ecuric	22:1 Δ_{13Z}	Colza (Brassicaceae)

Ghi chú: 18:3$\Delta_{9,12,15Z}$: 18 là acid béo có mạch dài 18 carbon; 3: tổng số các nối đôi C=C có trong mạch và ở tại C_9, C_{12} và C_{15}; *Z*: nối đôi có cấu hình *Z* .

Bảng 2: Thành phần tương đối của acid béo thường gặp trong một số dầu - mỡ.

Loại mỡ và dầu béo	Acid béo bão hòa (%)				Acid béo bất bão hòa (%)		
	C_{12}	C_{14}	C_{16}	C_{18}	$C_{18:1}$	$C_{18:1}$	$C_{18:3}$
	Lauric	Myristic	Palmitic	Stearic	Oleic	Ricinoleic	Linoleic
Mỡ động vật							
Mỡ	-	1	25	15	50	-	6
Bơ	2	10	25	10	25	-	5
Mỡ người	1	3	25	8	46	-	10
Mỡ cá voi	-	8	12	3	35	-	10

Dầu thực vật							
Dừa	50	18	8	2	6	-	1
Bắp	-	1	10	4	35	-	45
Olive	-	1	5	5	80	-	7
Đậu nành	-	-	7	5	60	-	20
Lanh	-	-	5	3	20	-	20
Thầu dầu	-	-	-	1	8	85	4

✱ ***Lớp sáp*** là chất liệu tráng phủ lên hệ thống màng cutin. Chất này không tan trong nước, không ẩm ướt, có nhiệt độ nóng chảy thấp.

Về cấu tạo hóa học, sáp là hỗn hợp của các ester của các acid carboxylic mạch dài với các alcol mạch dài. Các acid carboxylic thường có số carbon chẵn (16 đến 36 carbon), các alcol thường có số carbon chẵn (24 đến 36 carbon).

Thành phần chính của sáp ong là triacontyl hexadecanoat

$$CH_3—(CH_2)_{14}—\underset{\underset{O}{\|}}{C}—O—(CH_2)_{29}—CH_3$$

5.1.2. Triglycerid (dầu thực vật, mỡ động vật)

Dầu béo là lipid dự trữ của thực vật. Dầu béo hiện diện với hàm lượng thấp ở bộ phận rễ, lá, thân cành nhưng hiện diện với hàm lượng khá nhiều ở hạt và nhiều loại quả.

Dầu thực vật và mỡ động vật mặc dù có trạng thái bên ngoài có vẻ khác nhau (mỡ động vật, bơ là chất rắn còn dầu bắp, dầu phọng là chất lỏng) nhưng chúng có cấu trúc hóa học tương tự, đều là triacylglycerol hay thường được gọi là triglycerid. Dầu hoặc mỡ của một nguồn nguyên liệu thường là hỗn hợp của nhiều triglycerid.

Triglycerid là triester của glycerol với 3 acid carboxylic dây dài. Khi thủy giải với dung dịch nước kiềm, triglycerid cho glycerol và 3 hợp chất acid béo. Ba acid béo không nhất thiết phải giống nhau. Các acid béo thường là mạch thẳng, có số carbon chẵn, khoảng 12-20 carbon. Nối đôi C=C *thường hay* có cấu hình *Z*; tuy vậy, cũng có gặp nối đôi C=C cấu hình *E* trong dầu của một loài cây cho gỗ ở Trung Quốc (Bảng 2).

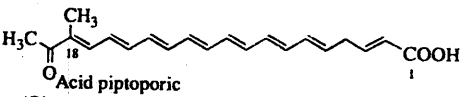
Trong thiên nhiên, có khoảng 40 loại acid béo. Tuy có nhiều loại acid béo, nhưng trong thành phần của đa số các acid béo thực vật, thường chỉ gặp một vài acid béo như acid palmitic, acid stearic, acid linoleic...

Bảng 1 cho biết công thức hoá học của một số acid béo thường gặp và bảng 2 cho biết thành phần cấu tạo tương đối của các acid béo trong một số dầu béo và mỡ động vật.

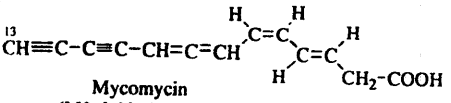
Phần trình bày trong bảng 1 và 2 cho thấy các acid béo thực vật thường là mạch thẳng với số carbon chẵn, khoảng 12-20 carbon, mang nối đôi C=C có cấu hình *Z*, tuy nhiên người ta cũng cô lập được từ thực vật một số acid béo bất thường, thí dụ như mạch với số lẻ carbon, có mang thêm nhánh hoặc vòng, có nối đôi C=C cấu hình *E*, có mang nối ba C≡C....

Các chất béo thực vật có thể là acid béo, nhưng cũng có thể là hợp chất với mạch carbon dài, mang những nhóm chức khác như: aldehyd, ceton, eter, ester, amid hoặc chỉ là alcan thuần túy. Một số hợp chất tiêu biểu được trình bày trong hình 15.

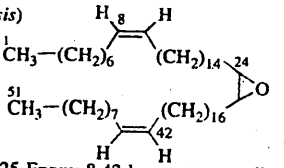
Acid malvalic
(hạt bông vải *Gossypium hirsutum*)



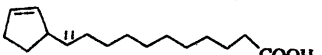
Acid piptoporic
(*Piptoporus australiensis*)



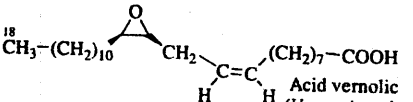
Mycomycin
(Một loài cây họ Cúc)



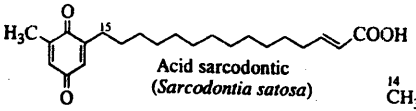
8Z, 42Z-24,25-Epoxy-8,42-henpentacontadien
(*Nauphoeta cinerea*)



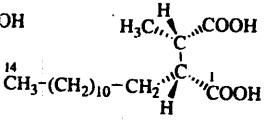
Acid hydnocarpic
(cây họ Flacourtiaceae)



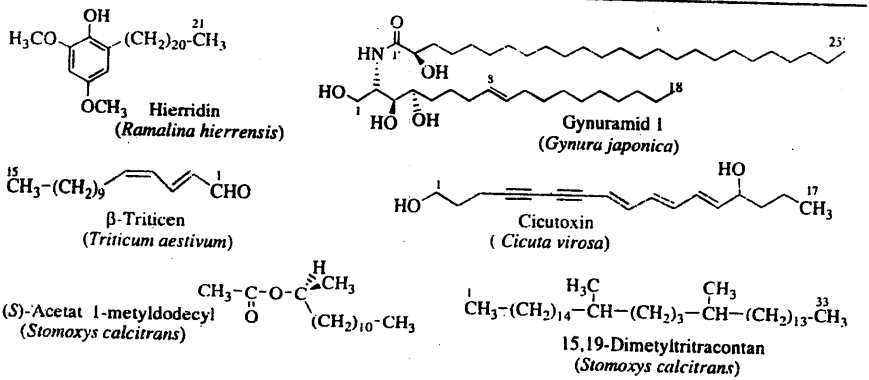
Acid vernolic
(*Vernonia galamensis*)



Acid sarcodontic
(*Sarcodontia satosa*)



Acid roccellic
(*Roccella fucoides*)

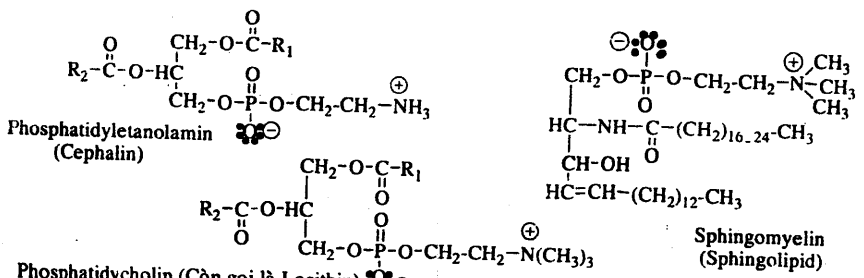


Hình 15: Công thức hóa học một vài chất béo thực vật

5.1.3. Các phospholipid

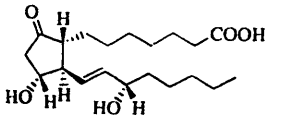
Là thành phần chính của màng tế bào thực vật và động vật. Các sphingolipid đặc biệt có nhiều ở mô thần kinh và não, thành phần chính của màng sợi thần kinh. Các phospholipid có công thức hóa học giống dầu béo, mỡ ở chỗ có khung sườn glycerol nối qua hai nối ester với hai acid béo và nối ester thứ ba với acid phosphoric. Nhóm phosphat luôn nối với một aminoalcol như cholin hoặc etanolamin.

Dung môi chiết tách tốt là cloroform: metanol: acid acetic: nước (50:25:7:3) hoặc metyl acetat: *n*-propanol: cloroform: metanol: 0,25% KCl (25:25:28:19:7).

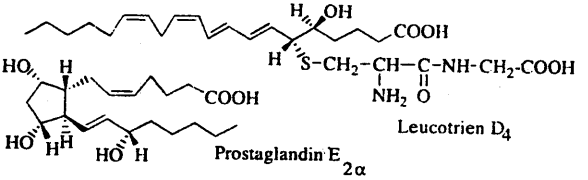


5.1.4. Prostaglandin

Prostaglandin là một nhóm hợp chất gồm acid carboxylic dây dài C_{20} có chứa một vòng năm và hai mạch dài. Có vài mươi prostaglandin với hoạt tính sinh học đa dạng. Chúng có thể làm giảm áp huyết, làm đông tụ máu, kiểm soát sự viêm sưng, ảnh hưởng đến hoạt động của thận, kích thích sự co thắt tử cung trong khi sinh nở.



Prostaglandin E_1

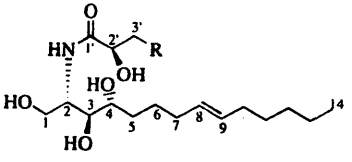


Leucotrien D_4

Prostaglandin $E_{2\alpha}$

5.1.5. Glycolipid

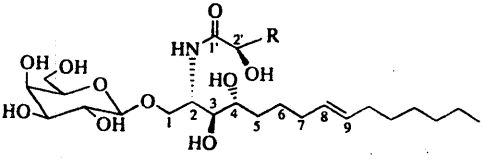
Gồm hai nhóm chính là ceramid và cerebrosid, với các mạch carbon dài ngắn khác nhau. Thường gặp trong một số loài thực vật, như cây Đinh lăng răng *Polyscias serrata,* Họ Ngũ Gia bì (Araliacea); cây Rau má *Hydrocotyle leucocephala,* Họ Ngò (Apiaceae); cây Chùy hoa tổng bao *Strobilanthes involucrata* Bl., Họ Ô rô (Acanthaceae); cây Bắt ruồi Drosera indica L., Họ Trường lệ (Droseraceae)....



R= $C_{17}H_{35}$ đến $C_{23}H_{47}$

Leucoceramid (*Hydrocotyl leucocephala*)

(Loại ceramid)



R= mạch carbon thẳng từ C_{14} đến C_{22}

Loại cerebrosid

5.2. Các thuốc thử đặc trưng để định tính sự hiện diện của chất béo trong cây

Phát hiện chất béo bằng sắc ký lớp mỏng với các thuốc thử phun xịt bản như sau:

5.2.1. 2',7'-Diclrofluorescein

Dung dịch 0,2% trong etanol 96%. Phun xịt bản và quan sát dưới ánh đèn UV, các vết lipid phát quang màu xanh lục trên nền tím.

5.2.2. Acid phosphotungstic

Dung dịch 20% trong etanol 96%. Phun xịt bản và sấy ở 70°C trong 20 phút.

5.2.3. Dung dịch 50% H_2SO_4 trong metanol

Phun xịt bản và sấy ở 100°C trong vài phút. Các sterol cho màu đỏ tía, các lipid cho màu nâu đen trên nền hầu như không màu.

5.2.4. Coomassie Brilliant Blue

Dung dịch 0,03% trong metanol 20%. Phun xịt bản và sấy ở 100°C trong vài phút, vết lipid cho màu xanh dương trên nền sáng.

5.2.5. Hơi iod

Phát hiện đơn giản nhưng không đặc trưng. Đặt bản mỏng vào bình kín, bão hòa bằng hơi iod, các vết lipid có màu vàng đến nâu nhạt.

5.2.6. Dicloro-2',7'-fluorescein- $AlCl_3$- $FeCl_3$

Dùng để phát hiện acid béo tự do

Dung dịch a: Dicloro 2',7'-fluorescein 0,05% trong etanol 96%.

Dung dịch b: Dung dịch 1% $AlCl_3$ trong etanol.

Dung dịch c: Dung dịch 1% $FeCl_3$ trong nước.

Phun bằng dung dịch a, sấy bản ở 100°C trong vài phút. Tiếp theo phun dung dịch b, sấy bản rồi tiếp theo phun dung dịch c. Các vết lipid cho hiện vết màu hồng tím trên nền vàng nhạt.

5.2.7. Glucose -Anilin

Dùng để phát hiện acid hữu cơ

Glucose (2 g) trong 20 ml nước cất, 2ml anilin trong 20 ml etanol, cho tất cả vào bình định mức và thêm butanol vào cho đủ 100 ml. Phun xịt bản và

sấy ở 110°C trong 5-10 phút, vết acid hữu cơ cho màu nâu trên nền sáng.

5.3. Phương pháp tách chiết chất béo ra khỏi cây

Khi chiết bột cây bởi những dung môi không phân cực hoặc dung môi phân cực, các dung môi này cũng chiết luôn các chất béo, sau này chính các chất béo sẽ làm cản trở quá trình cô lập các hợp chất hữu cơ khác. Muốn loại bỏ các chất béo, sáp có thể thực hiện theo các cách sau:

5.3.1. Loại béo bằng eter dầu hỏa

Khi chiết bột cây bằng eter dầu hỏa sẽ chiết chung các chất béo, chất màu, các sterol.

• Sử dụng nhiệt độ lạnh: Nếu lượng chất béo nhiều, có thể để dung dịch eter dầu hỏa này vào trong tủ lạnh ở -10°C trong vài ngày, các chất béo, sterol sẽ đóng váng lên trên bề mặt dung dịch hoặc kết tủa; vớt hoặc lọc để thu lấy chất béo.

• Muốn lấy riêng sterol ra khỏi chất béo có thể thực hiện sự xà phòng hóa theo qui trình đã trình bày ở sơ đồ 4.

• Có thể sử dụng kỹ thuật sắc ký cột silica gel giải ly cột đầu tiên bằng eter dầu hoả hoặc bằng hexan để loại bỏ các chất béo.

5.3.2. Sử dụng acetat chì

Acetat chì là tác chất để tạo kết tủa nói chung, người ta thường sử dụng dung dịch acetat chì để loại bỏ các chất béo, clorophyl, các chất màu khác... Có thể thay thế acetat chì bằng $Al(OH)_3$, $Fe(OH)_3$, $Pb(OH)_2$...

Cao chiết ở dạng nhầy được hòa tan vào dung dịch alcol-nước chứa trong một becher, có thể đun nóng nếu cần. Rót vào dung dịch này một dung dịch nước 2-5% acetat chì, khuấy đều, sẽ có tủa trắng hiện ra đầy becher. Để yên qua đêm để cho chất kết tủa lắng xuống đáy. Gạn nhẹ lấy lớp nước bên trên cho vào một becher sạch khác (lọc ngang tờ giấy lọc). Lớp nước này nếu còn lẫn một ít tủa trắng thì lọc ngang qua một lớp celit (sử dụng phễu buchner và máy lọc áp suất kém). Dung dịch nước qua lọc không còn chứa chất béo, chứa các hợp chất hữu cơ khác cần cho quá trình nghiên cứu.

Celit là đất sét diatomit đã được tinh chế thương mại, được sử dụng như chất trợ lọc. Thành phần của celit là SiO_2 (90%), một lượng nhỏ CaO, Al_2O_3, Fe_2O_3.

5.3.3. Sử dụng kỹ thuật sắc ký cột với cột nhồi là silica gel pha đảo

Khi cao chiết mẫu cây được nạp trên đầu cột silica gel pha đảo, giải ly cột trước tiên bằng metanol thì các chất phân cực sẽ ra khỏi cột, còn các chất béo còn giữ lại trong cột.

5.3.4. Tách chiết các ceramid, cerebrosid

Các hợp chất này rất tương đối phân cực, có thể cô lập được bằng chiết tách mẫu cây trước tiên bằng metanol. Cao metanol này được hòa vào nước, rồi chiết lỏng–lỏng lần lượt với etyl acetat và butanol. Các ceramid, cerebrosid sẽ ở trong phân đoạn etyl acetat. Muốn sắc ký lớp mỏng, cần thực hiện hai chiều. Chiều đầu tiên với hệ dung ly cloroform: metanol: 7N hydroxid ammonium (65: 30: 4). Bản mỏng được sấy khô và xoay bản 90°C rồi giải ly cho chiều thứ nhì với hệ dung ly cloroform: metanol: acid acetic: nước (170: 25: 25: 6).

6. HỢP CHẤT GLYCOSID

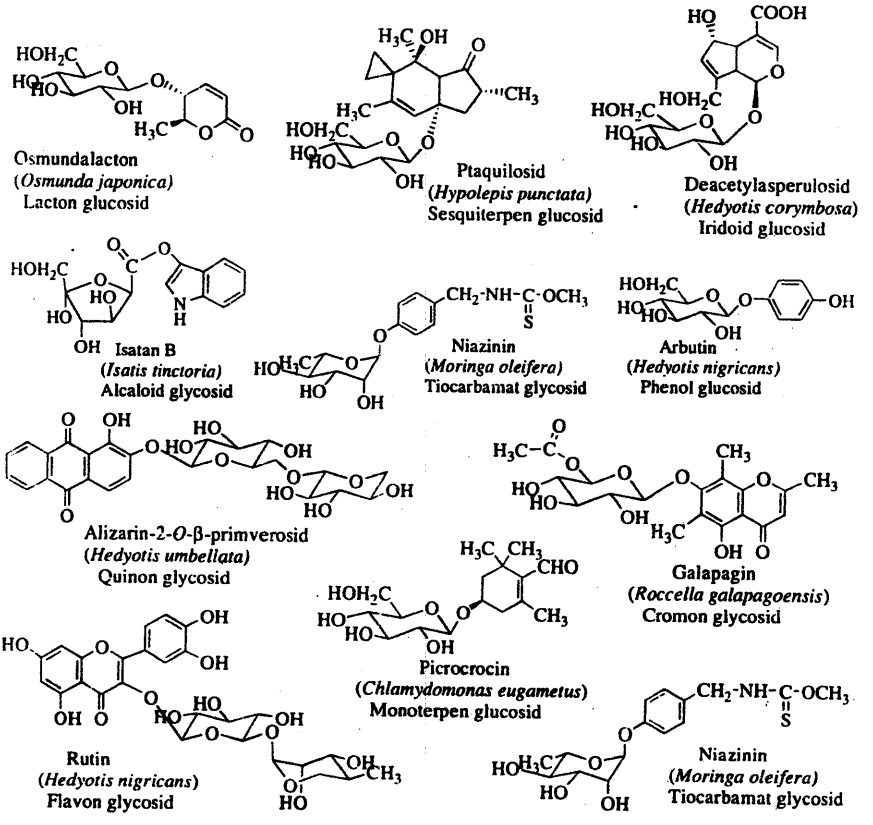
6.1. Đại cương về hợp chất glycosid

Các glycosid hiện diện trong rất nhiều họ thực vật và ở tất cả các bộ phận cây: lá, vỏ, hạt... Các glycosid thường là chất kết tinh và có vị đắng.

Glycosid là hợp chất mà cấu trúc hóa học gồm có hai phần: phần đường và phần không đường thường được gọi là aglycon. Dưới tác dụng của enzym thực vật hoặc dung dịch acid hoặc kiềm, glycosid bị thủy phân thành aglycon và phần đường.

Phần đường của glycosid: Phần đường phổ biến là D-glucose, D-galactose, L-arabinose, L-rhamnose, D-xylose, acid glucuronic, acid galacturonic và một số đường khác. Công thức của một số monosacarid theo hình chiếu Fischer và theo công thức Haworth được trình bày trong hình 16.

Phần aglycon của glycosid: Phần aglycon rất đa dạng và gồm tất cả các loại hợp chất tự nhiên như: monoterpen, sesquiterpen, diterpen, triterpen, steroid, iridoid, flavonoid, alcaloid, quinonoid, polyphenol... Một số hợp chất tiêu biểu được trình bày trong hình 17.

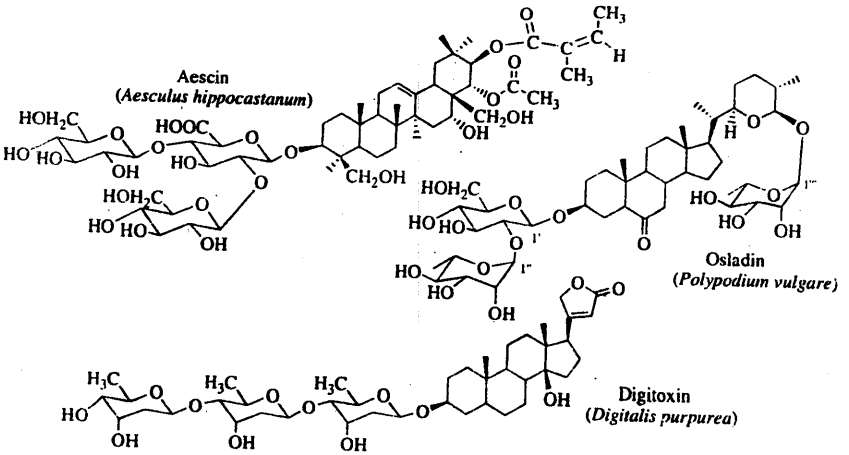


Hình 17: Cấu trúc hóa học của một vài hợp chất glycosid

Saponin: Là một glycosid phân bố khá rộng trong thực vật, có một số tính chất đặc trưng: khi hòa vào nước sẽ có tác dụng làm giảm sức căng bề mặt của dung dịch và tạo nhiều bọt; saponin làm vỡ hồng cầu còn được gọi là tính phá huyết. Saponin thường ở dạng vô định hình, có vị đắng. Saponin rất khó tinh chế; có điểm nóng chảy thường cao từ 200°C trở lên và có thể cao

hơn 300°C. Saponin bị tủa bởi acetat chì, hydroxid barium, sulfat amonium... có thể lợi dụng tính chất này để cô lập saponin.

Dựa vào cấu trúc aglycon, người ta chia saponin thành hai nhóm lớn là saponin steroid và saponin triterpenoid. Riêng saponin triterpenoid gồm có pentacyclic (gồm nhóm olean, nhóm ursan, nhóm hopan...) và tetracyclic (gồm nhóm dammaran, nhóm cucurbitan...). Cấu trúc hóa học của một vài saponin được trình bày trong hình 18.



Hình 18: Cấu trúc hóa học của một vài saponin

6.2. Phương pháp chiết tách các glycosid ra khỏi cây

Cấu trúc hóa học của glycosid rất đa dạng nên tính chất phân cực của mỗi phân tử thay đổi tùy theo cấu trúc của aglycon và số phân tử đường gắn vào aglycon, vì thế không thể có một phương pháp chung nào cho tất cả các glycosid, phải xét từng trường hợp cụ thể.

Nói chung các glycosid có tính phân cực khá mạnh, nên không tan trong eter dầu hỏa, hexan, benzen nhưng tan được trong cloroform, dietyl eter (các monoglycosid), tan tốt trong alcol, nước. Người ta thường chiết glycosid bằng nước nóng, etanol, metanol hoặc hỗn hợp alcol-nước 50-90%. Qui trình tổng quát chiết tách glycosid được trình bày trong sơ đồ 5.

Trước tiên, bột cây được loại béo bằng hexan hoặc eter dầu hỏa, bột cây còn lại được chiết tiếp bằng alcol 50-100 % (etanol, metanol). Dung dịch alcol được thêm một ít nước và được loại tạp bằng dung dịch acetat chì 20%. Cũng có thể loại tạp bằng $Pb(OH)_2$, $Al(OH)_3$, $Fe(OH)_3$... Lọc bỏ tủa. Dung dịch nước trong này được cho thêm dung dịch nước bão hòa Na_2SO_4 để tủa acetat chì. Lọc lấy phần nước trong. Dung dịch nước này được tận chiết lỏng-lỏng với cloroform, etyl acetat và butanol. Các dung dịch chiết này được làm khan nước bằng Na_2SO_4 hoặc $MgSO_4$ khan, rồi đuổi dung môi sẽ thu được cao. Cao cloroform chứa monoglycosid (aglycon nối với một phân tử đường), các cao etyl acetat, cao butanol chứa polyglycosid (hợp chất gồm aglycon nối với nhiều phân tử đường, có thể các phân tử đường nối với nhau thành chuỗi đường hoặc có thể aglycon nối với nhiều monosacarid ở những vị trí khác nhau).

6.3. Phương pháp thủy giải các glycosid để xác định phần đường

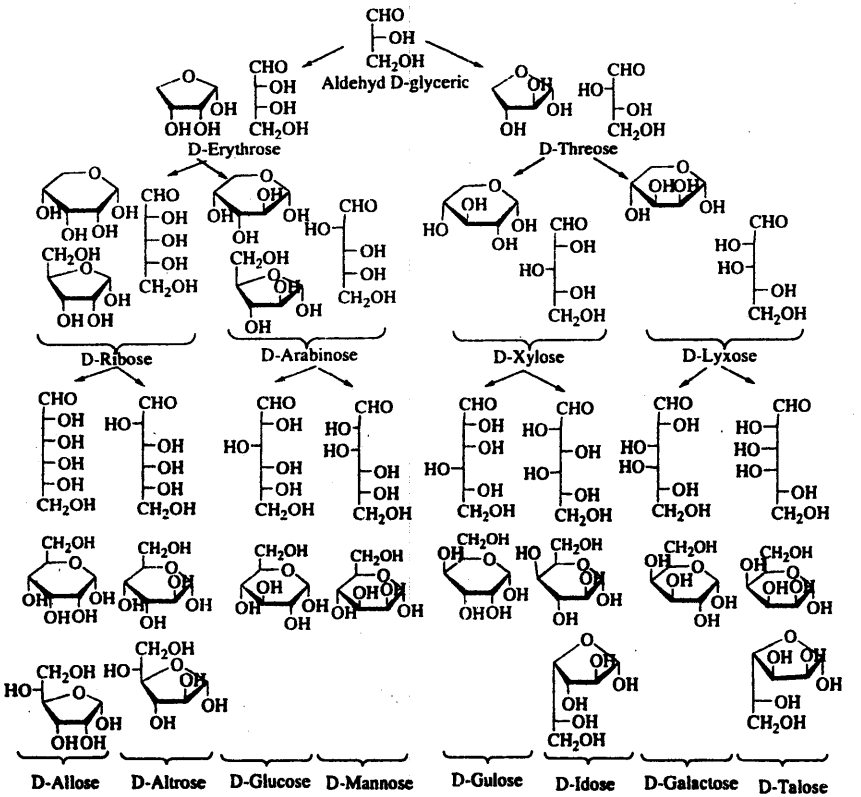
Rất khó xác định cấu trúc hóa học bằng các phương pháp phổ nghiệm (NMR...) đối với những hợp chất glycosid có nhiều phân tử đường gắn vào aglycon, là vì các proton -C<u>H</u>-OH hoặc carbon -<u>C</u>H-OH của các phân tử đường cho các mũi cộng hưởng với độ dịch chuyển hóa học cùng tập trung vào một vùng; vì thế, người ta thường thủy phân glycosid để khảo sát riêng phần aglycon và phần đường.

Có thể thủy phân glycosid bằng enzym hoặc bằng dung dịch acid. Việc thủy phân bằng dung dịch acid tương đối phức tạp: tùy thuộc vào nồng độ dung dịch acid, nhiệt độ, thời gian thủy phân sao cho có thể thủy phân triệt để mà đồng thời bảo tồn được cấu trúc của aglycon không bị phá hủy hoặc biến đổi. Do cấu trúc glycosid đa dạng: số phân tử đường của mỗi glycosid khác nhau, các nối hóa trị giữa đường-đường cũng như giữa đường-aglycon không giống nhau... vì thế không thể có một điều kiện chung nào cho tất cả các glycosid, phải xét từng trường hợp cụ thể.

Trong nghiên cứu, trước khi tiến hành thủy phân một lượng lớn glycosid (cần phải có phổ NMR toàn thể glycosid để dự đoán trước cấu trúc của hợp chất) cần phải có các bước nghiên cứu thăm dò với những lượng mẫu nhỏ. Bắt đầu với nồng độ acid thấp và thời gian thủy phân ngắn và sẽ nâng

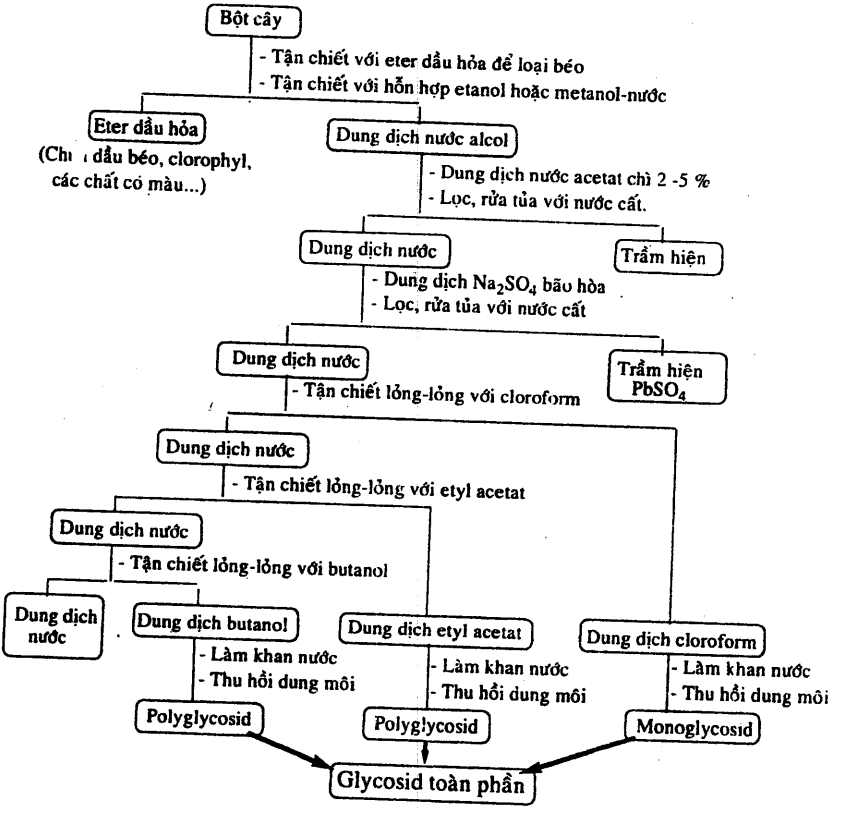
dần lên cho đến khi đạt các thông số tối ưu cho phản ứng thủy phân trên hợp chất cần khảo sát.

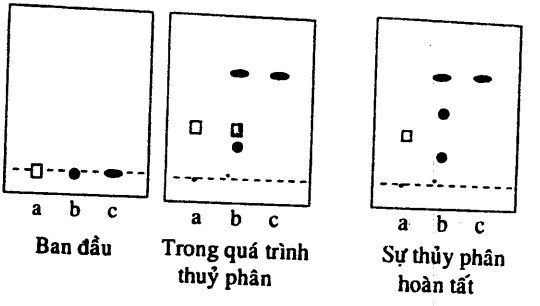
Theo dõi quá trình thủy phân bằng sắc ký lớp mỏng (Hình 19). Khi thực hiện sắc ký lớp mỏng phải chấm đồng thời trên cùng một bản: dung dịch đang thủy phân (khảo sát phản ứng theo thời gian), mẫu glycosid ban đầu và chất chuẩn aglycon, nếu có.



Hình 16: Công thức một số đường

Sơ đồ 5: Qui trình tách chiết glycosid ra khỏi cây





a: Hợp chất glycosid ban đầu

b: Dung dịch đang trong quá trình thủy phân

c: Aglycon chuẩn (nếu có)

Hình 19: Sử dụng kỹ thuật sắc ký lớp mỏng để theo dõi quá trình thủy phân glycosid

6.3.1. Thuỷ phân bằng con men (enzym)

Thông thường con men thủy phân hiện diện sẵn trong cây tươi, đủ để tự thủy phân glycosid.

Để thực hiện sự thủy phân glycoside, người ta thường sử dụng enzym là β-glucosidase (enzym lấy từ con sên *Helix pomatia*), cách tiến hành như sau: Mẫu glycosid (10 mg), dung dịch đệm acid acetic-acetat natri pH = 4-5 (2 ml), enzym β-glucosidase (10 mg), nước cất (1 ml). Ủ yên ở nhiệt độ phòng khoảng 28°C trong 1-2 ngày. Theo dõi quá trình thủy phân bằng sắc ký lớp mỏng. Sau khi thủy giải hoàn tất, thêm vào 5 ml nước cất và chiết lỏng-lỏng với dietyl eter. Lớp dietyl eter này được làm khan nước và được đuổi dung môi ở áp suất thấp cho đến khô thu được aglycon. Phần nước còn lại được làm đậm đặc để phân tích đường.

6.3.2. Thuỷ phân bằng dung dịch acid (HCl, H_2SO_4...)

Để cắt đứt nối của phần đường gắn vào aglycon qua nhóm chức –OH của aglycon, thu được aglycon và đường.

✳ Nếu phần aglycon bền vững với acid, có thể sử dụng các dung dịch acid mạnh như dung dịch 5-18% HCl, dung dịch 5-70% H_2SO_4, với thời gian 5- 6 giờ ở nhiệt độ 100°C.

✳ Nếu phần aglycon dễ bị biến đổi với acid, cần sử dụng điều kiện nhẹ nhàng với CH_3COOH 50% với thời gian 5- 6 giờ, ở nhiệt độ 70°C hoặc tốt nhất là thủy phân bằng enzym.

Một vài thí dụ cụ thể về sự thủy phân glycosid.

• *Thuỷ phân bằng hỗn hợp Kiliani*

Dung dịch acid gồm (HCl đậm đặc: CH_3COOH: H_2O) (10: 35: 55). Điều kiện thủy phân: 4 mg hợp chất glycosid/ 1 ml dung dịch acid. Đun hoàn lưu hỗn hợp trong 1 giờ, ở nhiệt độ 100°C. Thêm vào một lượng nước gấp đôi, đuổi dung môi ở áp suất thấp cho đến khô. Thực hiện như thế 2 lần để loại hết acid acetic. Cắn còn lại được hòa tan vào một ít nước, thực hiện việc chiết kiệt lỏng-lỏng với cloroform để thu lấy phần aglycon. Phần nước còn lại được sử dụng để phân tích đường.

• *Thuỷ phân theo phương pháp đề nghị bởi Mizuo Mizuno*[20].

Cho mẫu glycosid (10 mg) vào dung dịch HCl 10% trong metanol 50% (5 ml). Đun hoàn lưu cách thủy trong 2- 5 giờ. Đuổi metanol. Thêm một ít nước và chiết lỏng-lỏng với etyl acetat etyl. Phần etyl acetat được làm khan nước với Na_2SO_4 và đuổi dung môi ở áp suất thấp thu được aglycon. Phần nước còn lại được trung hòa bằng cách cho thêm Na_2CO_3 hoặc Ba_2CO_3 cho đến khi pH trung tính. Lọc, dung dịch qua lọc được cô đặc để phân tích đường.

6.3.3. Thuỷ phân bằng dung dịch kiềm

Để cắt, đứt các nối ester hoặc nối của đường gắn vào aglycon ngang qua nhóm chức ester của aglycon, thu được aglycon-COOH và đường.

Cho mẫu glycosid (10 mg) vào dung dịch 5% NaOH (10 ml). Đun hoàn lưu trong 2- 5 giờ. Thêm 5 ml nước cất và acid hóa với HCl 1N đến pH= 6. Chiết lỏng-lỏng với butanol, phần butanol này được làm khan nước với Na_2SO_4 và đuổi dung môi ở áp suất thấp thu được aglycon-COOH. Lớp nước được cô đặc để phân tích đường.

6.4. Các thuốc thử đặc trưng để định tính phần đường[19].

6.4.1. Thuốc thử Molisch (Phản ứng của đường aldose, cetose)

Thử nghiệm này có thể trực tiếp trên cao chiết thô.

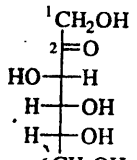
✱ *Thử trong ống nghiệm.* Dung dịch thuốc thử: 1% α-naptol trong etanol 80% (hoặc dung dịch 5% blue thymol trong etanol 80%, hoặc dung dịch 5% resorcinol trong etanol 80%).

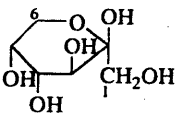
Cách thử: Trong một ống nghiệm có chứa 1-2 mg mẫu thử, thêm 1 ml H_2SO_4 đậm đặc, thêm 2-3 giọt dung dịch thuốc thử vào ống nghiệm một cách nhẹ nhàng sao cho không khuấy trộn hỗn hợp lên, mà dung dịch này nằm thành một lớp ở trên mặt. Phản ứng dương tính nếu có xuất hiện ở mặt phân cách hai dung dịch một vòng màu tím hoặc màu đỏ tùy loại thuốc thử.

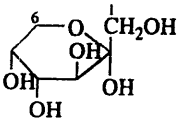
Phản ứng do đường pentose, hexose khi gặp acid mạnh sẽ bị khử 3 phân tử nước để biến thành furfural và sau đó biến thành 5-hydroxyfurfural,

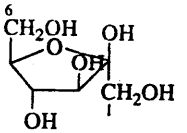
hợp chất này ngưng tụ với α-naptol để cho màu tím, hoặc với blue thymol cho màu đỏ, với resorcinol cho màu đỏ hoa anh đào.

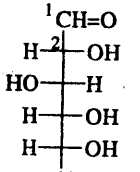
Phản ứng cũng dùng để phân biệt aldose và cetose: các cetose thí dụ như fructose cho phản ứng nhanh còn các aldose thí dụ glucose cho phản ứng chậm.

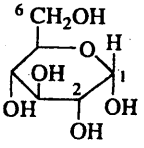

D-Fructose

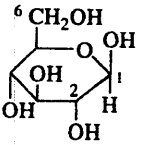

β-D-Fructopyranose


α-D-Fructopyranose


β-D-Fructopyranose


D-Glucose


β-D-Glucopyranose


α-D-Glucopyranose

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*:

• Hòa tan thymol (0,5 g) trong etanol (95 ml), thêm vào cẩn thận H_2SO_4 đậm đặc: dung dịch để phun xịt bản mỏng. Sấy bản 15-20 phút ở 120°C cho xuất hiện vết màu hồng.

• Dung dịch 15% α-naptol trong etanol (10 ml), H_2SO_4 đậm đặc (6 ml), etanol (40 ml), nước cất (4 ml): dung dịch để phun xịt bản mỏng. Sấy bản 15-20 phút ở 120°C cho xuất hiện vết màu xanh tím.

6.4.2. Thuốc thử Tollens: *Phản ứng của đường khử.*

✱ *Thử trong ống nghiệm.* Dung dịch thuốc thử: dung dịch nitrat bạc 10% (0,5 ml), dung dịch 10% NaOH (0,5 ml), thêm từng giọt NH_4OH đến khi tan hết tủa.

Cách thử: Trong một ống nghiệm có chứa 1-2 mg mẫu thử, thêm 5 giọt pyridin, 4 giọt thuốc thử mới pha. Phản ứng dương tính nếu có xuất hiện gương bạc bám lên thành ống nghiệm hoặc có tủa màu đen Ag kim loại.

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*:

Dung dịch nước 0,1 N $AgNO_3$ (1 thể tích), dung dịch 5N NH_4OH (5 thể tích). Không nên tồn trữ hỗn hợp dung dịch này lâu vì có thể gây nổ do sự thành lập chất azid bạc. Phun xịt dung dịch lên bản mỏng, sấy bản 5-10 phút ở 105°C cho xuất hiện vết màu đen xậm.

6.4.3. Thuốc thử naptoresorcinol tức naptalen-1,3 diol. *Phản ứng của đường khử, đường acid uronic*

✱ *Thử trong ống nghiệm.* Dung dịch thuốc thử: naptoresorcinol (0,2 g), H_3PO_4 (10 g), etanol (90 ml)

Cách thử: Trong một ống nghiệm có chứa 1-2 mg mẫu thử, 5 giọt thuốc thử. Phản ứng dương tính nếu có xuất hiện màu hồng, lục, xanh dương.

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: naptoresorcinol (2 g), H_3PO_4 đậm đặc (10 ml), etanol (100 ml). Phun xịt dung dịch lên bản mỏng. Sấy bản 5-10 phút ở 105°C cho xuất hiện vết màu đen xậm.

6.4.4. Thuốc thử anilin-acid phosphoric hoặc anilin-acid *orto*-ptalic. *Phản ứng của đường khử*

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: Dung dịch 2N anilin trong butanol bão hòa nước (1 thể tích), thêm vào dung dịch 2N acid phosphoric pha trong butanol (2 thể tích).

Hoặc anilin (1 g), acid *orto*-ptalic (1,66g), butanol bão hòa nước (100 ml). Phun xịt dung dịch lên bản mỏng. Sấy bản 5-10 phút ở 105°C cho xuất hiện vết màu đỏ.

6.4.5. Thuốc thử carbazol-acid sulfuric. *Phản ứng của đường*

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: carbazol (0,5 g), etanol (95 ml), H_2SO_4 đậm đặc (5 ml). Chỉ sử dụng thuốc thử mới pha. Dung dịch để phun xịt bản mỏng, sấy bản 10 phút ở 120°C cho xuất hiện vết màu tím nhạt trên nền xanh dương.

6.4.6. Thuốc thử phenol-acid sulfuric. *Phản ứng của đường*

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: phenol (5 g), etanol (95 ml),

H_2SO_4 đậm đặc (5 ml). Chỉ sử dụng thuốc thử mới pha. Phun xịt dung dịch lên bản mỏng. Sấy bản 10 phút ở 110°C cho xuất hiện vết màu nâu.

6.4.7. Thuốc thử Keller-Killiani. Phản ứngđặc trưng của đường 2-deoxy

✱ *Thử trong ống nghiệm.* Dung dịch thuốc thử: dung dịch nước 5% sulfat sắt tam $Fe_2(SO_4)_3$ (1 ml), acid acetic băng (99 ml)

Cách thử: Trong một ống nghiệm có chứa 0,1 mg mẫu thử, 1 ml dung dịch thuốc thử mới pha, H_2SO_4 đậm đặc (1-2 giọt). Phản ứng dương tính nếu có xuất hiện màu xanh lục sau 1-2 phút.

6.5. Các thuốc thử đặc trưng để định tính saponin[10, 14].

Để phát hiện sự hiện diện của saponin trong cao chiết cần phải thử tính tạo bọt.

6.5.1. Tính chất tạo bọt của saponin

Tạo bọt là một đặc trưng của saponin, nên đây là một trong những phương pháp chính xác định tính sự hiện của saponin.

• ***Thử định tính saponin***: Bột cây (1 g), etanol (5 ml), đun cách thủy 5 phút, lọc lấy dung dịch alcol để thử nghiệm trong hai ống nghiệm có kích cỡ bằng nhau.

Ống số 1: 5 ml HCl 0,1 N (pH = 1) + 3 giọt dung dịch alcol chứa mẫu thử

Ống số 2: 5 ml NaOH 0,1 N (pH = 13) + 3 giọt dung dịch alcol chứa mẫu thử

Bịt miệng ống nghiệm và lắc mạnh cả hai ống nghiệm trong 1 phút và để yên, quan sát các cột bọt bong bóng trong cả hai ống nghiệm.

✱ Nếu ***cột bọt*** trong cả hai ống nghiệm ***cao bằng nhau*** và bọt có độ bền như nhau, có thể có saponin triterpenoid.

✱ Nếu ống pH =13 có cột bọt cao hơn nhiều so với với ống pH =1, có thể có saponin steroid.

• ***Thử định lượng saponin***: Nếu thử nghiệm sơ bộ thấy bột cây có chứa saponin, tiếp theo có thể dựa vào chỉ số tạo bọt để đánh giá.

Dược điển Pháp định nghĩa về chỉ số tạo bọt: Chỉ số tạo bọt là độ pha loãng nước sắc nguyên liệu bột cây, có cột bọt cao 1 cm sau khi lắc trong ống nghiệm, tiến hành trong điều kiện qui định như sau.

Trong một erlen 500 ml, cho vào bột cây (1 g), nước sôi (100 ml). Đun sôi nhẹ trong 30 phút, lọc, để nguội và rót vào bình định mức 100 ml và thêm nước cất cho đủ 100 ml. Lấy 10 ống nghiệm (có chiều cao 16 cm, đường kính ống 1,6 cm), đánh số từ 1 đến 10. Rót nước sắc vào mỗi ống nghiệm, lần lượt 1 ml nước sắc (cho ống số 1), 2 ml (ống số 2), 3 ml (ống số 3).... Thêm nước cất vào mỗi ống sao cho mỗi ống đủ 10 ml. Bịt miệng các ống nghiệm và lắc theo chiều dọc của ống trong 15 giây, mỗi giây lắc 2 lần. Để yên 15 phút, đo chiều cao của cột bọt trong mỗi ống nghiệm.

•(*i*) Nếu chiều cao của cột bọt của tất cả các ống đều thấp dưới 1 cm: đánh giá chỉ số bọt < 100

•(*ii*) Nếu ống có chiều cao của cột bọt 1 cm là ống từ số 3 đến số 10, thí dụ đó là ống số 4, chỉ số bọt được tính như sau: ống này có 4 ml nước sắc 1% nghĩa là tương đương 0,04 g bột nguyên liệu, vậy

$$\text{Chỉ số bọt} \quad \frac{10 \times 1}{0{,}04} = 250$$

•(*iii*) Nếu ống có chiều cao của cột bọt 1 cm là ống số 1 hoặc số 2, cần pha nước sắc đã có lúc ban đầu loãng đi 10 lần và thực hiện trở lại, khi tính kết quả thì nhân lên 10 lần.

•(*iv*) Nếu chiều cao của cột bọt của tất cả các ống đều cao hơn 1 cm, chỉ số bọt lớn hơn 1000, cần pha loãng và thực nghiệm lại như mục (*iii*).

6.5.2. Để phát hiện phần aglycon của saponin

Để phát hiện phần alycon của saponin là steroid và triterpenoid, sử dụng các thuốc thử steroid-triterpenoid đã trình bày ở phần trên.

6.6. Các thuốc thử đặc trưng để định tính các glycosid tim[10, 14]

Sử dụng các thuốc thử dành cho các hợp chất có chứa vòng lacton cũng như sesquiterpen lacton đã trình bày ở phần trên.

6.6.1. Thuốc thử KEDDE

Với acid 3,5-dinitrobenzoic và KOH, kết quả dương tính cho màu đỏ tím.

6.6.2. Thuốc thử BALJET

Với acid picric và NaOH, kết quả dương tính cho màu vàng cam đến đỏ sậm.

6.6.3. Thuốc thử LEGAL: *phát hiện glycosid tim.*

Với natri nitroprussiat và NaOH, kết quả dương tính cho màu đỏ sậm.

6.6.4. Thuốc thử 2,4,2',4'-tetranitrodiphenyl: *phát hiện glycosid tim.*

- Dung dịch phun xịt a: Dung dịch 2,4,2',4'-tetranitrodiphenyl bão hòa trong benzen.

- Dung dịch phun xịt b: Dung dịch 10% KOH trong metanol 50%.

Phun xịt bản mỏng với dung dịch a, để khô tự nhiên ngoài không khí rồi phun tiếp dung dịch b, kết quả dương tính cho màu xanh dương.

6.6.5. Thuốc thử acid 2,4,6-trinitrobenzoic: *phát hiện glycosid tim.*

- Dung dịch phun xịt a: Dung dịch nước 0,1% acid 2,4,6-trinitrobenzoic (1 thể tích), dimetylformamid (1 thể tích).

- Dung dịch phun xịt b: Dung dịch nước 5% Na_2CO_3.

- Dung dịch phun xịt c: Dung dịch nước 5% NaH_2PO_4.

Phun xịt bản mỏng với dung dịch a, để khô tự nhiên ngoài không khí. Phun tiếp dung dịch b; sấy 4-5 phút ở 100°C, phun tiếp dung dịch c. Kết quả dương tính cho màu cam-đỏ.

6.7. Các thuốc thử đặc trưng để định tính các aglycon iridoid [10, 14]

Để phát hiện phần aglycon iridoid

Thuốc thử Trim-Hill: CH_3COOH (10 ml), dung dịch nước 0,2% $CuSO_4$ (1 ml), HCl đậm đặc (0,5 ml).

Thử nghiệm: 1 ml dung dịch chất cần thử, 2-3 giọt thuốc thử Trim-Hill. Kết quả dương tính là khi đun nhẹ sẽ xuất hiện màu xanh dương.

7. HỢP CHẤT PHENOL

7.1. Đại cương về hợp chất phenol

Các hợp chất phenol dùng để chỉ chung các hợp chất mà trong cấu trúc có vòng benzen mang một hoặc nhiều nhóm chức hydroxy –OH. Trong thiên nhiên, các hợp chất phenol là: flavonoid (đã có mục trình bày ở phần trên), xanthon, coumarin, quinon, các phenol đơn vòng, các polyphenol (lignin, tanin...), ...

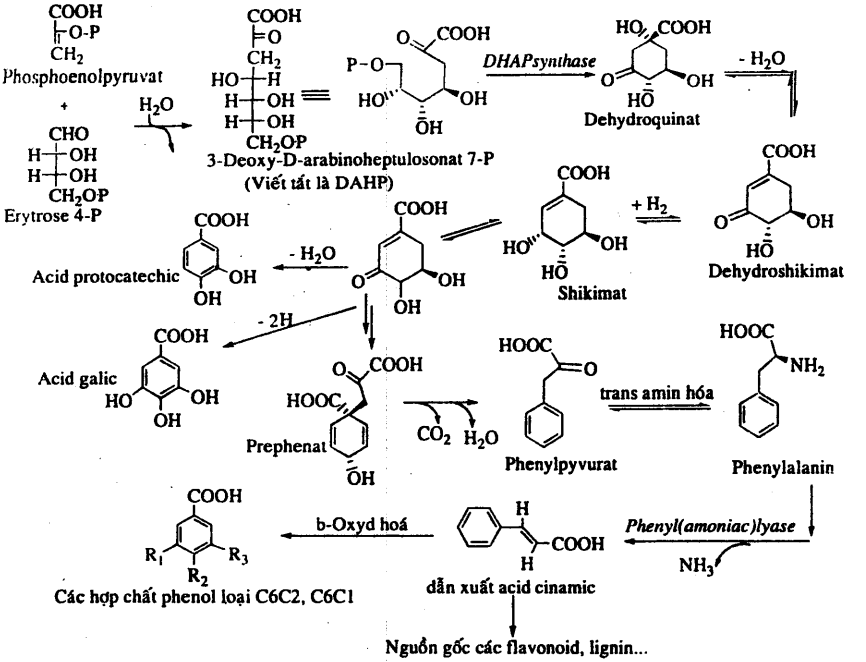
Các hợp chất phenol dễ tan trong nước vì chúng thường hiện diện trong cây ở dạng glycosid. Nhiều hợp chất phenol có màu sắc tự nhiên, nên có thể dựa vào đặc điểm này để theo dõi chúng trong quá trình chiết tách, cô lập chúng ra khỏi cây cỏ. Các hợp chất phenol thường bị hủy hoại do tác dụng của con men phenolase vốn luôn có mặt trong cây vì thế nên sử dụng alcol nóng để chiết tách do alcol giúp hạn chế tác dụng của enzym. Các phenol đều tác dụng với thuốc thử $FeCl_3$ để cho ra màu xanh lục, tím hoặc đen.

Sự sinh tổng hợp các hợp chất phenol đã được biết từ rất sớm, đi từ ba amino acid là phenylalanin, tyrosin, tryptophan. Quá trình xảy ra ngang qua một chuỗi các phản ứng phức tạp để cho phenylalanin, tyrosin (10 giai đoạn), tryptophan (12 giai đoạn) và từ đó dẫn đến những hợp chất phenol.

Hình 20 là sơ đồ sinh tổng hợp để tạo ra các loại hợp chất phenol loại C_6C_1, C_6C_2 cũng như các flavonoid, lignin.

Sự sinh tổng hợp không tạo ra duy nhất phần nhân thơm mà là tạo ra hợp chất gọi chung là C_6C_3, nghĩa là *nhân benzen có mang một mạch nhánh.*

Các hợp chất phenol được chia thành nhiều nhóm và gọi tên tổng quát theo số carbon của hợp chất thí dụ: hợp chất loại C_6C_1, loại C_6C_2 hoặc loại C_6C_3 ...



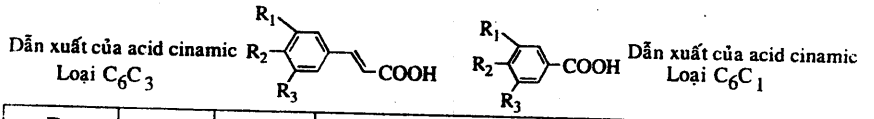
Hình 20: Sự sinh tổng hợp một số hợp chất phenol

7.1.1. Hợp chất loại C_6C_1 và C_6C_2

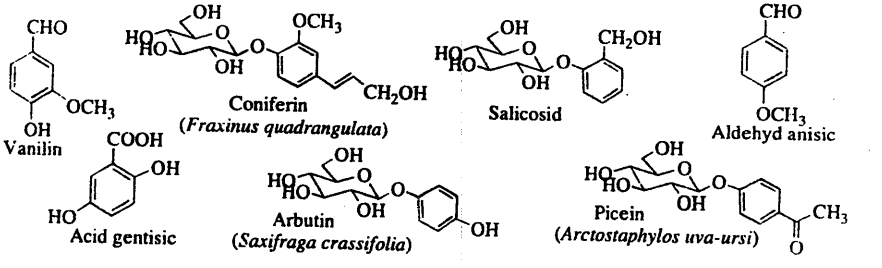
Các hợp chất này do sự β-oxid hoá đã cắt ngắn *mạch nhánh* của cinamat (cùng các dẫn xuất của nó có mang các nhóm hydroxy –OH hoặc metoxy $-OCH_3$). *Tanin thủy giải được* với cấu trúc hoá học là ester của glucose với acid galic (Đã trình bày ở phần trên) cũng thuộc loại phenol C_6C_1. Cấu trúc hóa học các hợp chất loại C_6C_1 và C_6C_3 thường gặp trong cây cỏ, được trình bày trong bảng 3.

Nhóm chức carboxyl của hợp chất phenol acid có thể bị khử để thành nhóm chức aldehyd, alcol... Các loại hợp chất phenol thường hiện diện ở dạng ester (benzyl cinamat ...) hoặc dạng glucosid như trong hình 21.

Bảng 3: Cấu trúc hóa học và tên thông thường một số hợp chất phenol loại C_6C_1 và C_6C_3



R_1	R_2	R_3	Hợp chất phenol C_6C_3	Hợp chất phenol C_6C_1
H	H	H	Acid cinamic	Acid benzoic
H	OH	H	Acid *p*-coumaric	Acid *p*-hydroxybenzoic
OH	OH	H	Acid cafeic	Acid protocatechic
OCH_3	OH	H	Acid ferulic	Acid vanilic
OCH_3	OH	OCH_3	Acid sinapic	Acid syrigic
OH	OH	OH	Acid trihydroxycinamic	Acid galic

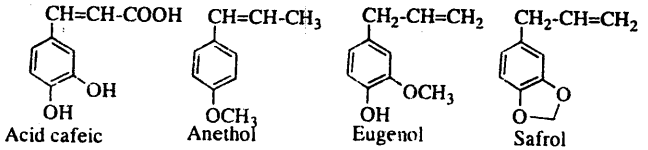


Hình 21: Cấu trúc hóa học của một vài hợp chất phenol tự nhiên

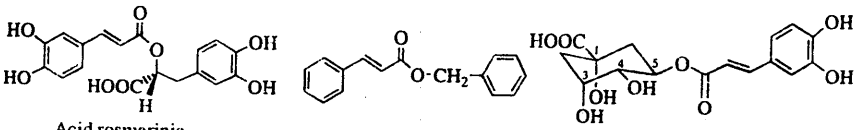
7.1.2. Hợp chất loại C_6C_3 (Phenylpropanoid)

Loại này được chia thành nhiều nhóm:

(*i*): *Nhóm trực tiếp*: Nhiều hợp chất trong nhóm này là thành phần chủ yếu của các loại tinh dầu, như anethol, safrol...

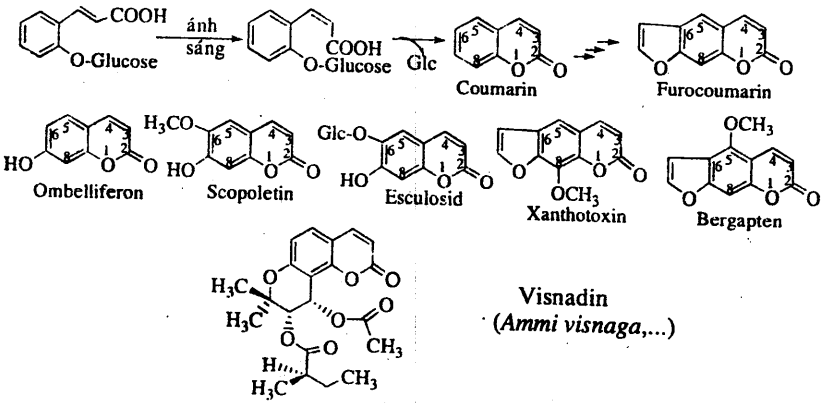


(*ii*): *Nhóm được ester hóa*: rất thường gặp trong giới thực vật. Acid clorogenic có tính chất gần giống như tanin, hiện diện trong nhiều loài thực vật, acid rosmarinic được xem là "tanin của họ Lamiaceae",....



(*iii*): *Nhóm đóng vòng*: Dẫn xuất *o*-hydroxycinamat đóng vòng tạo thành coumarin. Coumarin cộng thêm một đơn vị isopren thành furocoumarin (hiện diện nhiều trong họ Apiaceae, Rutaceae....); cũng có thể cộng thêm hai đơn vị isopren.

Các mạch nhánh isopren rất hoạt tính, có thể được epoxy hóa, hydroxyl hóa, đóng vòng... để tạo ra nhiều loại hợp chất khác nhau thí dụ như hợp chất visnadin được thấy trong nhiều loài cây: *Phlododicarpus sibiricus, Ammi visnaga, Peucedanum japonicum*....



Hình 22: Sự tạo thành các coumarin và furocoumarin

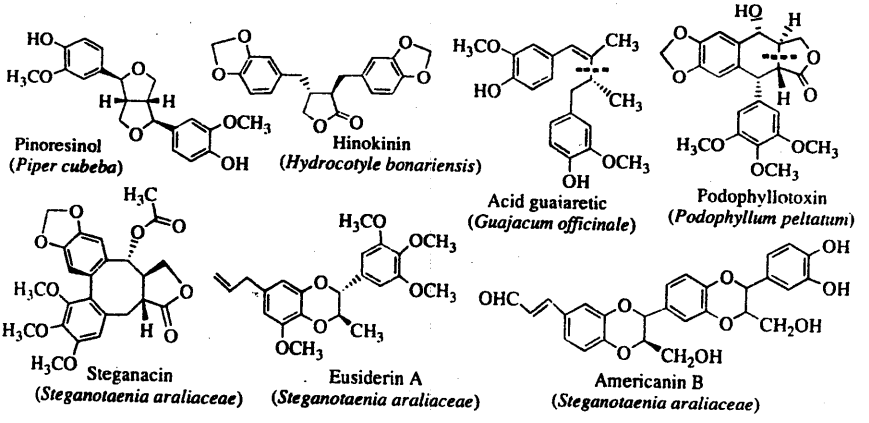
(*iv*): *Nhóm các hợp chất lignan:* Khi hai đơn vị phenyl-propanoid được nối lại với nhau ngang qua một nối carbon–carbon, đưa đến sự tạo thành loại hợp chất lignan.

Người ta phân biệt lignan và neolignan. Trong loại ***lignan***, nối carbon–carbon được tạo thành bởi hai mạch nhánh của hai phenyl–propanoid; trong loại ***neolignan***, nối carbon–carbon được tạo thành bởi bất kỳ hai carbon nào, vì thế tạo ra nhiều cấu trúc khác nhau. Trong loại này cũng gặp những nối ester, nối carbon–carbon thứ nhì.

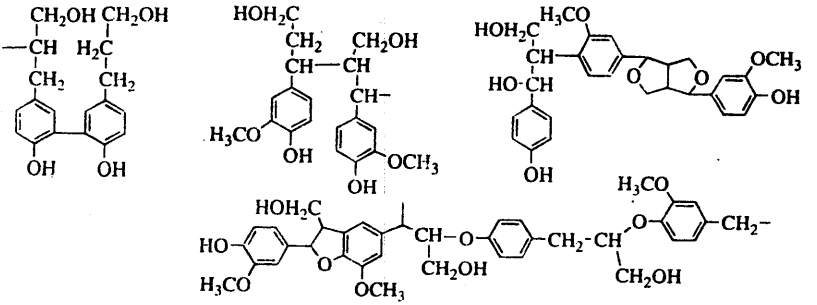
Cũng có lignan do ba (hoặc nhiều hơn) đơn vị phenyl–propanoid nối với nhau như hợp chất americanin B.

Lignin, loại biopolymer quan trọng thứ nhì sau cellulose, là vật liệu cấu tạo của vách tế bào thực vật. Lignin là hợp chất có trọng lượng phân tử lớn, không có nối với glucose. Lignin thường có màu vàng, nâu-vàng.

Lignin được tạo thành do sự copolymer hóa giữa ba monomer là alcol *p*-hydroxycinamic, alcol coniferic, alcol synapylic (ba alcol này được gọi chung là monolignol). Sự kết nối các monomer có tính bất kỳ, không lặp lại; nối nhau ngang qua nhóm chức eter, carbon-carbon...



Hình 23: Cấu trúc hóa học của một vài hợp chất lignan, neolignan



Hình 24: Một số kiểu nối liên phân tử giữa các monomer trong lignin

7.1.3. Hợp chất thuộc loại hỗn hợp $C_6C_1C_6$, $C_6C_2C_6$, $C_6C_3C_6$,

Từ các dẫn xuất cinamat, con đường sinh tổng hợp được tiếp tục để tạo thành các loại xanthon, pyron, flavonoid, ...

Các loại flavonoid đã được trình bày ở phần trên.

Tanin: Các tanin thuộc nhóm hỗn hợp nói trên, là nhóm hợp chất polyphenol phân bố rộng rãi trong họ thực vật. Người ta gặp tanin hằng ngày trong cuộc sống (trà, rượu vang đỏ, nhiều loại trái cây nhất là trong vỏ trái măng cục...). Các tanin có trọng lượng phân tử khoảng 500-3000. Các tannin do mang nhiều nhóm –OH nên ít nhiều (tùy theo trọng lượng phân tử của chúng) hòa tan trong nước tạo nên dung dịch nhớt.

Trong kỹ nghệ làm giày da, người ta sử dụng tanin để thuộc da vì tanin có tính chất làm đông tụ các protein của lớp da trong (chân bì): tanin tạo các nối hydrogen liên phân tử giữa các nhóm –OH và $–NH_2$ của protein với các nhóm –OH phenol của tanin. Khi nếm tannin, có cảm giác se lưỡi là do tanin làm kết tủa các enzym có trong nước miếng, khiến nước miếng bị mất đi tính chất của nó là làm trơn láng phần bề mặt trong của miệng; cũng vì lý do này các loài động vật ăn cỏ ít chọn ăn các loài cây có chứa hàm lượng tanin cao. Các nghiên cứu cho thấy có sự biến mất tanin cũng như nhiều loại hợp chất phenol trong nhiều loại quả trái chín (so với khi quả còn xanh) là do cây cỏ đó đã sử dụng lại các hợp chất nói trên.

Tanin được phân thành hai nhóm chính là "tannin thủy giải được" và "tanin hóa đặc" tùy theo việc tanin có hoặc không bị thủy giải bởi men hoặc dung dịch acid.

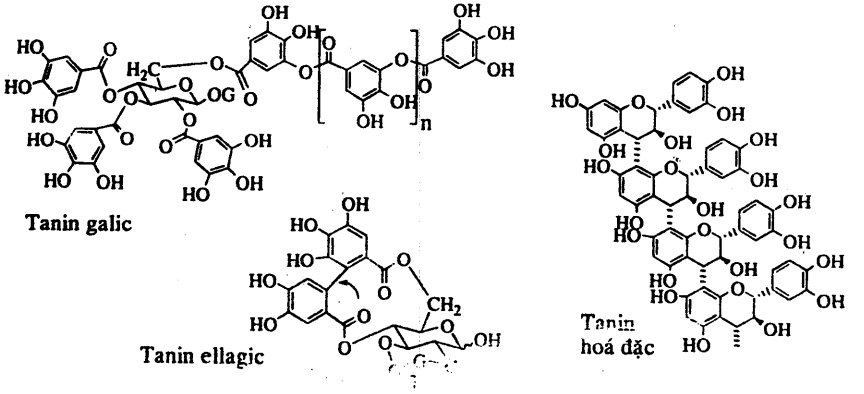
• *Tanin hóa đặc* là sự polymer của một vài flavanol thí dụ như catechol hoặc epicatechol. Loại này khác với tanin thủy giải được vì nó không bị thủy giải dưới tác dụng của acid vô cơ loãng.

Cấu trúc hóa học của một vài loại tanin được trình bày trong hình 25.

• *Tanin thủy giải được* có cấu trúc hoá học là ester của glucose với acid galic. Người ta cũng chia tanin loại này ra là tanin galic và tanin ellagic.

✳ *Tanin galic* có cấu trúc hóa học gồm một nhân trung tâm, là đường glucose. Các nhóm –OH tại các carbon C-1, 2, 3, 4 hoặc 6 của đường glucose này tạo nối ester với từ 1 đến *n* số phân tử acid galic.

✳ *Tanin ellagic:* Do sự hiện diện của các nối carbon-carbon trong nhân glucose và các nối carbon-carbon giữa hai nhân benzen của hai phân tử acid galic, làm cho cấu trúc tanin thêm sát chặt, rắn chắc nhiều hơn, cũng vì thế độ hòa tan cũng kém đi.



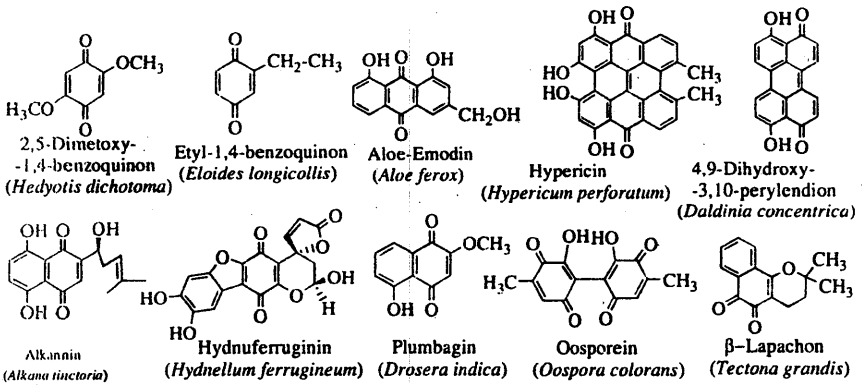
Hình 25: Cấu trúc của tanin

7.1.4. Hợp chất thuộc loại quinon

Trong các loài thực vật, có thể gặp các loại quinon như benzoquinon, naptoquinon, antraquinon... Các naptoquinon, antraquinon thường gặp trong gỗ, vỏ cây, rễ, chúng hiện diện ở trạng thái tự do hoặc kết hợp với đường.

Các quinon có tính kích thích nên một số quinon như emodol, rhein... được sử dụng trong ngành y để làm thuốc nhuận trường.

Cấu trúc hóa học của một vài quinon tự nhiên được trình bày trong hình 26.



Hình 26: Cấu trúc hóa học của một vài quinon tự nhiên

7.2. Các thuốc thử đặc trưng để định tính sự hiện diện hợp chất phenol

Để phát hiện các loại hợp chất phenol, có thể sử dụng những thuốc thử chung và có những thuốc thử riêng cho từng loại.

7.2.1. Dung dịch 4-nitroanilin *để phát hiện phenol*

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: Dung dịch phun xịt: dung dịch 0,5% 4-nitroanilin trong HCl 2N (5 ml); dung dịch nước 5% $NaNO_2$ (0,5 ml). Trộn lẫn hai dung dịch lại, thêm vào dung dịch nước 15% CH_3COONa (15ml).

7.2.2. Thuốc thử $FeCl_3$ *để phát hiện phenol*

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: Dung dịch phun xịt: dung dịch 5% $FeCl_3$ trong nước hoặc trong etanol. Phun xịt và sấy bản 5 phút ở 90°C. Các phenol cho vết có màu xanh dương đen.

7.2.3. Thuốc thử Millon *để phát hiện phenol, glucosid phenol*

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: Dung dịch phun xịt: hòa tan thủy ngân (5 g) trong acid nitric bốc khói (10 g), thêm nước cất (10 ml). Các phenol và glucosid phenol cho vết có màu vàng đến cam trên nền trắng.

7.2.4. Vanilin, HCl *để phát hiện catechol*

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: Dung dịch phun xịt: dung dịch 1% vanilin trong HCl đậm đặc. Phun xịt bản và để khô ở nhiệt phòng, catechol xuất hiện màu đỏ.

7.2.5. Thuốc thử Benedict với $CuSO_4$–citrat natri *để phát hiện flavonoid, coumarin có mang nhóm orto-dihydroxy*

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: Dung dịch phun xịt: $CuSO_4$, $5H_2O$ (1,73 g), Na_2CO_3 khan (10 g), citrat natri (17,3g) trong 100 ml nước cất.

Quan sát bản mỏng dưới áng ánh UV: hợp chất flavonoid, coumarin mang nhóm *orto*-dihydroxy bị mất đi ánh sáng huỳnh quang của nó, trong khi các hợp chất flavonoid, coumarin không mang nhóm *orto*-dihydroxy thấy ánh sánh huỳnh quang rõ mạnh hơn.

7.2.6. Thuốc thử acetat magnesium *để phát hiện quinon*

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: Dung dịch phun xịt: dung dịch 0,5% acetat magnesium trong metanol. Phun xịt và sấy bản 5 phút ở 90°C. Các antraquinon cho vết có màu từ cam đến tím.

7.2.7. Thuốc thử Bortrager với KOH/ MeOH *để phát hiện quinon, coumarin*

✱ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: Dung dịch phun xịt: dung dịch 5% KOH trong metanol. Phun xịt và sấy bản 5 phút ở 90°C. Các quinon,

coumarin cho vết có màu đỏ, tím hoặc xanh lục.

7.2.8. Thuốc thử etanolamin *để phát hiện quinon*

✳ *Thử nghiệm bằng sắc ký lớp mỏng*: Hoà tan *para*-quinon (benzoquinon) trong pyridin (10 ml) và *n*-butanol (40ml). Sau khi phun xịt, xuất hiện ngay lập tức vết màu đỏ.

7.2.9. Thuốc thử gelatin mặn *để phát hiện tanin*

✳ *Thử trong ống nghiệm*: NaCl (5 g), gelatin (0,5 g) hòa tan trong 100 ml nước cất. Phản ứng dương tính có tanin khi xuất hiện trầm hiện màu vàng nhạt, để lâu hóa thành màu nâu.

7.2.10. Thuốc thử Stiasny *để phát hiện tanin*

✳ *Thử trong ống nghiệm*: Formol 36% (20 ml), HCl đậm đặc (10 ml). Phản ứng dương tính có tanin khi xuất hiện trầm hiện màu đỏ.

7.3. Các phương pháp chiết tách hợp chất phenol ra khỏi cây

7.3.1. Chiết tách hợp chất phenol, coumarin, quinon

Cấu trúc hóa học của các hợp chất phenol trình bày ở phần trên cho thấy các hợp chất này đều có chứa một hoặc nhiều nhân benzen, mạch nhánh alcan ngắn, mang các nhóm chức hydroxy (–OH), metoxy ($–OCH_3$), carboxyl (–COOH)... nên nói chung các hợp chất phenol có tính phân cực từ trung bình đến mạnh, tùy theo hợp chất có mang ít hoặc nhiều nhóm chức hydroxy, carboxyl.... Vì vậy muốn chiết tách các hợp chất này ra khỏi bột cây, cần sử dụng các dung môi có độ phân cực tăng dần như benzen, etyl eter, cloroform, etyl acetat, etanol...

Đa số hợp chất phenol có mang nhóm chức –OH phenol nên có thể sử dụng dung dịch nước kiềm loãng hoặc carbonat loãng, nóng (thí dụ dung dịch Na_2CO_3 2N) để chiết chúng ra khỏi bột cây, tiếp theo acid hóa để thu được tủa (nếu hàm lượng ít, không thể cho tủa, thì có thể chiết dung dịch nước đó bằng dung môi hữu cơ).

Một số hợp chất coumarin, nhất là quinon có thể thăng hoa, có thể áp dụng kỹ thuật thăng hoa để thu lấy hợp chất. Tuy nhiên, chỉ nên áp dụng kỹ thuật này khi hợp chất đó có tính bền với nhiệt độ và có hàm

lượng cao trong bột cây.

7.3.2. Chiết tách tanin

Tanin hiện diện với hàm lượng cao trong thực vật, muốn chiết lấy tanin có thể sử dụng dung môi là nước. Làm tủa tanin bằng dung dịch gelatin mặn (dung dịch gồm 5 g NaCl, 0,5 g gelatin, 100 ml nước), bằng cách rót dung dịch gelatin mặn vào dung dịch chiết, khuấy nhẹ đều rồi để yên ở nhiệt độ phòng, tanin sẽ tủa. Tuy nhiên phương pháp có một số nhược điểm như: không thể ước đoán được lượng dung dịch gelatin cần sử dụng để có thể làm tủa hoàn toàn tanin; dung dịch gelatin có độ nhớt cao gây khó khăn trong thao tác thực nghiệm.

Có thể thay thế dung dịch gelatin mặn bởi dung dịch polyvinylpyrolidon (viết tắt là PVP), dung dịch này kém nhớt hơn. Với 20 mg cao chiết hòa tan trong 1 ml nước, chỉ sử dụng 1 ml dung dịch 5% PVP là đủ.

Có một phương pháp nhanh hơn là cho dung dịch chiết chảy ngang qua một cột sắc ký với pha tĩnh là polyamid, hoặc Sephadex LH-20 hoặc silica gel.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. **S. William Pelltier**. *Alkaloids: chemical and biological perpectives*. Volume 10. Pergamon. 136-141, 1996.

[2]. **Kirk Othmer**. *Concice encyclopedia of chemical technology*. A Wiley Interscience. John Wiley and Sons, 98-112, 1985

[3]. **Nguyễn Văn Đàn, Nguyễn Viết Tựu**. *Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc*. Nhà xuất bản Y học. 217-445, 1985

[4]. **Herausgegeben Von, Wolfgang Steglich, Burkhard Fugmann, Susanne Lang-Fugmann**. *Naturstoffe*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. New York. 1997.

[5]. **Jean Adrian, Jacques Potus**. *La science alimentaire de A à Z*. Techniques et Documentation Lavoisier, 397-415, 1995.

[6]. **J.F. Guthmann**. *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires*. Lavoisier-Tec et Doc. 374-405, 1991.

[7]. **Richard J.P. Cannell**. *Natural products isolation*. Humana Press. Totowa, New Jersey. 1998.

[8]. **K. Hostettmann, P.J. Pea**. *Biologically active natural products*. Clarendon Press-Oxford, 58-81, 1987.

[9]. **P.A. Cadby, R.G. Cooke, J.M. Edqards, W. Heller, C.W. Jefford, E. Lederer, P. Lefrancier**. *Progress in the chemistry of organic natural products*. Springer-Verlag, Wein. New York, **40**, 12-17, 1981

[10]. **Ngô Văn Thu**. *Hoá học saponin*. Trường Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh. 8-105, 1990.

[11]. **V.H. Heywood, J.B. Harborne**. *The biology and chemistry of the Compositae*. Academic press. London. New York, **40**, 12-17, 1981.

[12]. **E. Bloszyk, B. Geppert, B. Drozdz.** *Quantitative determination of sesquiterpene lactone in plant material by infrared spectroscopy.* Planta Medica, **34**, 78-86, 1978.

[13]. **T.A. Geissman, T.S. Griffin.** *Sesquiterpene lactones: acid-catalysed color reactions as an aid in structure determination.* Phytochemistry, **10**, 2475-2485, 1971.

[14]. **Nguyễn Văn Đàn, Ngô Ngọc Khuyến.** *Hợp chất thiên nhiên dùng làm thuốc.* Nhà xuất bản Y học. Hà Nội, 74-89, 1999.

[15]. **Jean-Louis Guignard.** *Biochimie végétale.* Dunod. Paris. 2000.

[16]. **Joseph D. Connolly, Robert A. Hill.** *Dictionary of terpenoids.* Volume 1. Chapman & Hall. London. 1991.

[17]. **John Mc. Murry.** *Organic chemistry.* Brooks/ Cole. Publishing Company. Toronto. Washington. 1099-1124. 1996

[18]. **Chu Phạm Ngọc Sơn.** *Dầu mỡ trong sản xuất và đời sống.* Nhà xuất bản TP. Hồ Chí Minh, 13-35, 1983

[19]. E. Merck. *Révélateur pour la chromatographie en couches minces et sur papier.* Merck-Darmstadt. Allemagne. 1975.

[20]. Mizuo Mizuno, Masaya Kato, Chiemi Misu, Munekazu Inuma, Toshiyuki Tanaka. *Journal of natural products.* **54**(5), 1447-1450, 1991.

CÁC PHƯƠNG PHÁP CÔ LẬP HỢP CHẤT HỮU CƠ

Chương 3

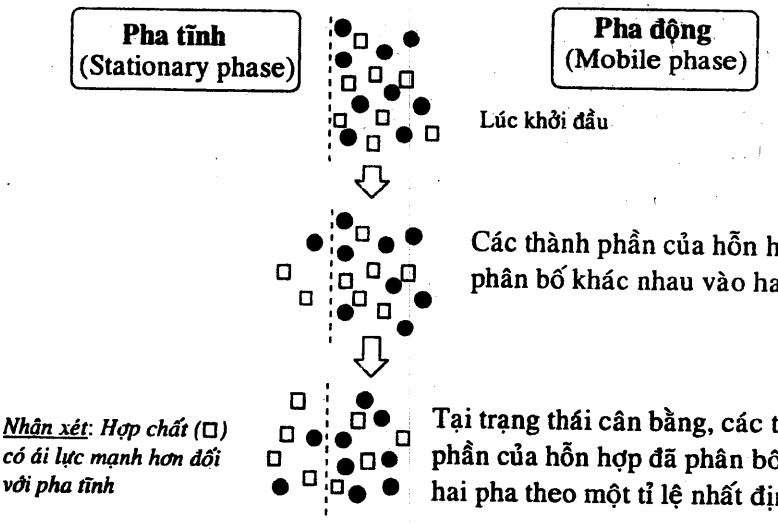
SẮC KÝ CỘT

Các tế bào sống chứa hằng trăm loại hợp chất hóa học khác nhau. Các hợp chất này bao gồm những đại phân tử như protein, acid nucleic, lipid cũng như các hợp chất có trọng lượng phân tử nhỏ... Những hợp chất nói trên có thể hiện diện ở số lượng nhỏ, dưới dạng vết (các enzym) hoặc ở số lượng nhiều (các protein cấu tạo...). Người ta muốn biết các thành phần hóa học của tế bào, nhằm hiểu rõ các quá trình biến đổi căn bản của nó, qua đó giúp cuộc sống loài người ngày thêm tốt đẹp. Muốn vậy, người ta phải tìm cách tách riêng chúng để xác định cấu trúc hoá học. Kỹ thuật tách riêng các hợp chất đã được Tswett (1903) sử dụng để tách các chất màu trong cây cỏ. Từ ngữ "chromatography" xuất xứ từ chữ "chroma" trong tiếng La Tinh có nghĩa là chất màu.

Ngày nay, sự sắc ký (chromatography) được sử dụng để tách tất cả mọi hợp chất dù có màu hay không, dù trọng lượng phân tử nhỏ hay lớn. Nhưng vì các phân tử sinh học rất thiên hình vạn trạng với trọng lượng phân tử lớn nhỏ khác nhau, tính chất phân cực nhiều ít khác nhau nên không thể nào có một kỹ thuật sắc ký chung cho các loại hợp chất khác nhau. Tài liệu này nhằm cung cấp một số kỹ thuật sắc ký căn bản để tách riêng từng loại hợp chất có tính chất đặc trưng.

1. CÁC NGUYÊN TẮC CĂN BẢN CỦA KỸ THUẬT SẮC KÝ

Sự sắc ký là một phương pháp vật lý để tách một hỗn hợp gồm *nhiều loại* hợp chất ra riêng thành từng *loại đơn chất*, dựa vào tính ái lực khác nhau của những loại hợp chất đó đối với một hệ thống (hệ thống gồm hai pha: một pha động và một pha tĩnh).



Hình 1: Hệ số phân chia là sự phân bố thí dụ: của 2 loại hợp chất (●) và (□) trong một hệ thống gồm có 2 pha: pha tĩnh và pha động

Việc tách hai hợp chất nào đó ra riêng có đạt được kết quả tốt hay không là tùy vào hệ số phân chia (partition coefficient). Bất kỳ một hợp chất nào khi được đặt vào một hệ thống gồm có 2 pha (thí dụ: hai pha lỏng-lỏng hoặc rắn–lỏng), lúc đạt đến trạng thái cân bằng, hợp chất đó sẽ phân bố vào mỗi pha với một tỉ lệ nồng độ cố định, tỉ lệ này thay đổi tùy vào các tính chất động học của hợp chất và của cả hai pha.

Hệ số phân chia K được biểu diễn như sau

$$K = \frac{C_s}{C_m} = \frac{\text{Nồng độ của hợp chất trong pha tĩnh}}{\text{Nồng độ của hợp chất trong pha động}}$$

Cũng tương tự, một hỗn hợp gồm nhiều loại hợp chất khác nhau khi được đặt vào một hệ thống gồm có 2 pha, mỗi loại hợp chất sẽ có ái lực riêng của nó đối với hai pha, vì thế sẽ có tương tác mạnh/ yếu khác nhau đối với pha tĩnh. Hệ quả là mỗi loại hợp chất sẽ di chuyển ngang qua pha tĩnh với một vận tốc khác nhau, nhờ vậy, kỹ thuật sắc ký có thể tách riêng các loại hợp chất (Minh họa trong hình 1).

Người ta phân biệt nhiều loại kỹ thuật sắc ký khác nhau dựa vào bản chất của hai pha sử dụng hoặc vào bản chất của các hiện tượng xảy ra trong quá trình tách các chất.

1.1. Phân loại sắc ký theo bản chất của hai pha sử dụng

Tuỳ thuộc vào bản chất của pha tĩnh và pha động, người ta phân biệt một số kỹ thuật sắc ký khác nhau

• ***Pha tĩnh***: có thể là chất rắn hoặc chất lỏng. Pha tĩnh tách riêng các hợp chất trong một hỗn hợp nào đó là nhờ vào tính chất hấp thu của nó.

✱ *Pha tĩnh là chất rắn*: thường là alumin hoặc silica gel đã được xử lý, nó có thể được nạp nén vào trong một cột (thí dụ: sắc ký cột hở ở áp suất thường hoặc sắc ký ở áp suất cao), hoặc được tráng thành một lớp mỏng, phủ lên trên bề mặt một tấm kiếng, tấm nhôm hoặc tấm nhựa (thí dụ sắc ký lớp mỏng).

✱ *Pha tĩnh là chất lỏng*: có thể là một chất lỏng được tẩm lên bề mặt một chất mang rắn hoặc một chuỗi dây carbon dài được gắn (bằng một nối hóa trị) lên trên chất mang rắn. Thí dụ trong sắc ký giấy, pha tĩnh là nước. Nước này là do sợi cellulose của tờ giấy đã hấp thu. Hoặc trong sắc ký khí, pha tĩnh là một chất lỏng có tính bền nhiệt, kém bay hơi, được tẩm phủ lên những hạt rắn có lỗ rỗng.

• ***Pha động***: có thể là chất lỏng hoặc chất khí.

✱ *Pha động là chất khí*: thí dụ trong kỹ thuật sắc ký khí. Trong trường hợp này chất khí đó được gọi là *khí mang* hoặc *khí vectơ*.

✱ *Pha động là chất lỏng*: thí dụ trong kỹ thuật sắc ký giấy, sắc ký lớp mỏng, sắc ký cột. Trong trường hợp này chất lỏng được gọi là dung môi giải ly (eluant).

Bảng 1: Các loại pha động và pha tĩnh thường được sử dụng trong kỹ thuật sắc ký.

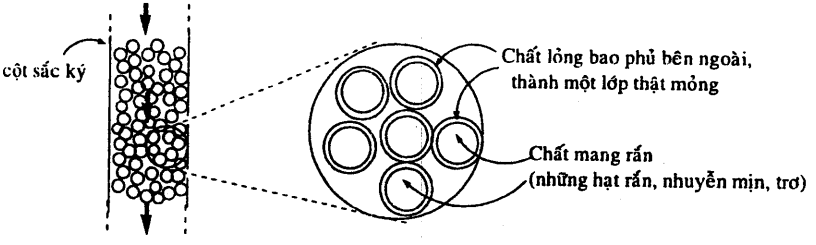
Pha động	Pha tĩnh	Tên gọi của kỹ thuật sắc ký
Chất lỏng	Chất rắn	Sắc ký lỏng–rắn (Sắc ký cột, sắc ký lớp mỏng)
Chất khí	Chất rắn	Sắc ký khí–rắn (gọi chung là sắc khí)
Chất lỏng	Chất lỏng	Sắc ký lỏng–lỏng (Sắc ký HPLC với cột nhồi pha đảo C-18)
Chất khí	Chất lỏng	Sắc ký khí–lỏng (gọi chung là sắc khí)

1.2. Phân loại sắc ký theo *bản chất* của hiện tượng xảy ra trong quá trình tách chất

1.2.1. Sắc ký phân chia (Partition chromatography)

✳ *Pha động* là chất lỏng hoặc chất khí (trong sắc ký khí). Tuy nhiên, trong sắc ký khí, độ hòa tan của các thành phần trong hỗn hợp không giữ vai trò quan trọng bằng áp suất hơi tương đối của chúng.

✳ *Pha tĩnh* là chất lỏng; đó là một lớp chất lỏng với chiều dầy thật mỏng, chất lỏng này được nối hóa học lên bề mặt của những hạt rắn, nhuyễn mịn, có tính trơ.



Hình 2: Tiêu biểu của sắc ký phân chia. Pha tĩnh lỏng là một lớp rất mỏng chất lỏng nối hóa học với bề mặt của chất mang rắn, trơ

Sự tách riêng các chất của một hỗn hợp dựa vào việc mỗi hợp chất của hỗn hợp đó sẽ có *hệ số phân chia khác nhau* giữa pha tĩnh (chất lỏng tẩm trên bề mặt của pha tĩnh) với pha động (cũng là một chất lỏng).

Hệ số phân chia tùy thuộc vào khả năng hòa tan của hợp chất vào mỗi pha, vào tính chất phân cực của: mỗi hợp chất, pha động, pha tĩnh. Nếu pha tĩnh tương đối phân cực, các hợp chất có tính phân cực mạnh sẽ bị nó giữ lại mạnh hơn so với các hợp chất kém phân cực, hệ quả là các hợp chất kém phân cực sẽ di chuyển ngang pha tĩnh nhanh hơn và ra khỏi cột sớm hơn so các hợp chất phân cực. Trong trường hợp ngược lại, nếu pha tĩnh kém phân cực, các chất phân cực sẽ ra khỏi cột trước các chất kém phân cực.

Trong hệ thống này, tính phân cực của pha động cũng giữ một vai trò quan trọng.

1.2.2. Sắc ký hấp thu (Adsorption chromatography)

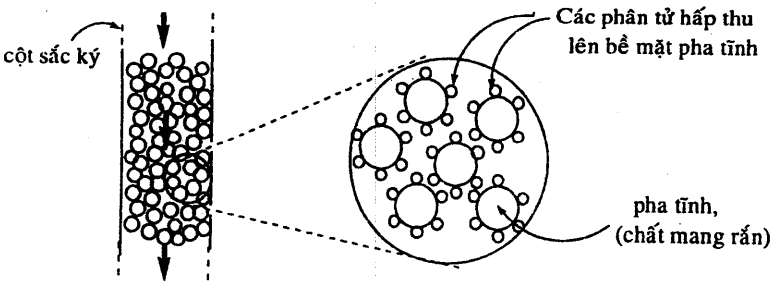
✳ *Pha động* là chất lỏng hoặc chất khí.

✳ *Pha tĩnh* là chất rắn; đó là những hạt rắn, nhuyễn mịn, có tính trơ, được nhồi trong một cái ống. Những hạt rắn trơ này cũng giống như những hạt rắn trong sắc ký phân chia, nhưng không có phủ chất lỏng ở bên ngoài; bản thân hạt rắn là pha tĩnh.

Trong sắc ký hấp thu, các chất của hỗn hợp (thay vì hòa tan vào pha tĩnh lỏng như trong trường hợp của sắc ký phân chia) sẽ hấp thu hoặc dính lên bề mặt của chất rắn pha tĩnh. Các hợp chất khác nhau sẽ có những mức độ hấp thu khác nhau lên pha tĩnh (dĩ nhiên chúng cũng tùy thuộc vào tính phân cực của pha động), hệ quả là trong quá trình pha động di chuyển, chúng sẽ tách xa nhau ra.

Sự hấp thu xảy ra là do sự tương tác lẫn nhau giữa các phân tử phân cực (tương tác lưỡng cực - lưỡng cực); do sự tương tác giữa những phân tử có mang các nhóm phân cực đối với pha tĩnh rắn là chất rất phân cực; do nối hydrogen, nối Van der Waal...

Trong sắc ký hấp thu, pha tĩnh thường sử dụng là những hạt silica gel hoặc alumin; trên bề mặt của những hạt này có mang nhiều nhóm –OH nên đây là những pha tĩnh có tính rất phân cực.

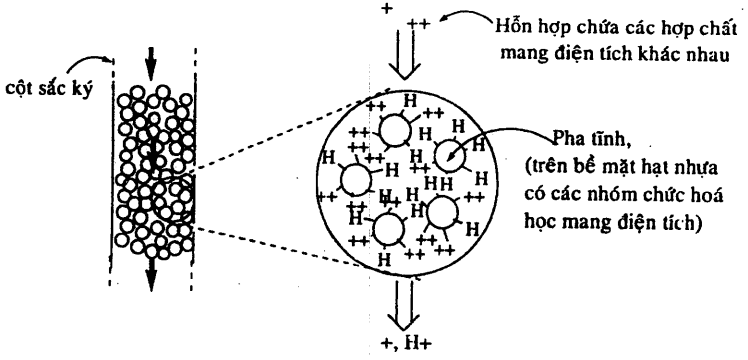


Hình 3: Tiêu biểu của sắc ký hấp thu. Pha tĩnh rắn là những hạt rắn, nhuyễn, trơ

1.2.3. Sắc ký trao đổi ion (Ion exchange chromatography)

* *Pha động* chỉ có thể là chất lỏng.

* *Pha tĩnh* là chất rắn, là những hạt hình cầu, rất nhỏ, có cấu tạo hóa học là polymer, nên được gọi là các hạt nhựa. Bề mặt của hạt mang các nhóm chức hóa học ở dạng ion. Có hai loại nhựa: nhựa trao đổi anion và nhựa trao đổi cation. Nhựa trao đổi anion mang nhóm chức có điện tích dương nên nhựa bắt giữ các ion âm của pha động; ngược lại, nhựa trao đổi cation mang nhóm chức có điện tích âm nên nhựa bắt giữ các ion dương của pha động. Sự bắt giữ xảy ra nhờ lực hút tĩnh điện giữa hai điện tích ngược dấu. Các loại nhựa trao đổi ion được sử dụng để tách các ion vô cơ hoặc hữu cơ.



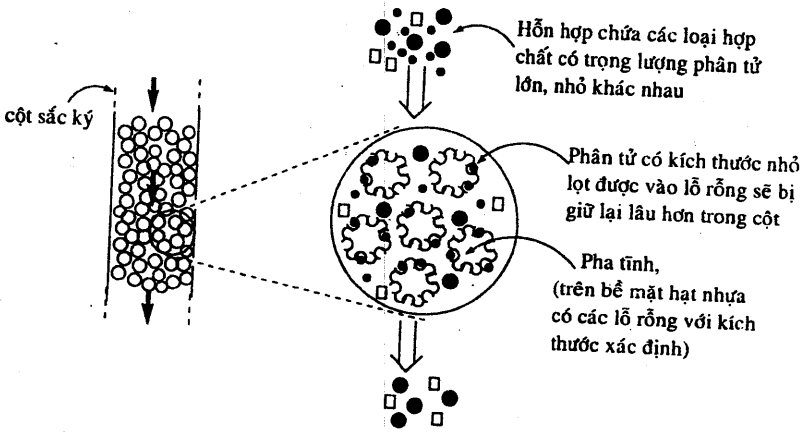
Hình 4: Tiêu biểu của sắc ký trao đổi ion

Sự tách riêng các chất của một hỗn hợp dựa vào việc hợp chất nào của hỗn hợp có mang điện tích ngược dấu với điện tích của hạt nhựa, bị hạt nhựa bắt giữ lại trong cột. Hợp chất mang nhiều điện tích gắn mạnh vào pha tĩnh, hợp chất nào mang ít điện tích gắn yếu và không mang điện tích không gắn, và ra khỏi cột trước.

1.2.4. Sắc ký lọc gel (Size exclusion chromatography; Gel filtration chromatography)

* *Pha động* chỉ có thể là chất lỏng.

* Pha tĩnh là chất rắn, đó là những hạt hình cầu bằng polymer, trên bề mặt của hạt có rất nhiều lỗ rỗng. Mỗi loại hạt nhựa có một kích cỡ nhất định, biết trước. (Do pha tĩnh được cấu tạo bởi những nguyên liệu tương đối trơ nên những loại tương tác liệt kê ở phần trên không đáng kể).



Hình 5: Tiêu biểu của sắc ký lọc gel.

Sự tách riêng các hợp chất của một hỗn hợp dựa vào những phân tử có kích thước nhỏ có thể dễ dàng chui vào những lỗ rỗng đó và bị giữ lâu trong cột; còn những phân tử có kích thước lớn, không thể lọt vào lỗ rỗng, bị giải ly khỏi cột.

Việc tách chất dựa vào trọng lượng phân tử của các hợp chất. Các phân tử được giải ly khỏi cột theo thứ tự trọng lượng phân tử giảm dần: phân tử có

trọng lượng phân tử lớn sẽ ra khỏi cột trước, phân tử có trọng lượng phân tử nhỏ sẽ ra sau.

Bảng 2: Cơ chế lưu giữ chất của một số loại pha tĩnh.

Kiểu hấp thu	Cơ chế bắt giữ chất trong cột sắc ký
Hấp thu rắn – lỏng (Liquid-solid adsorption)	Hấp thu trên bề mặt của pha tĩnh tùy thuộc vào *tính phân cực* của pha tĩnh và pha động.
Pha tĩnh - tạo nối (bonded phase)	Có cả hai hiện tượng: có thể chất tan sẽ *phân bố* giữa hai pha hoặc có sự *tương tác hấp thu* giữa chất tan và pha tĩnh-tạo nối
Trao đổi ion (Ion exchange)	Tương tác điện tích giữa chất tan ở dạng ion (anion hoặc cation) và nhóm chức được gắn vào pha tĩnh ở dạng đối ion (cation hoặc anion)
Đuổi tùy theo kích cỡ (size exclusion)	Hiệu quả của sự rây lọc tùy theo kích cỡ của lỗ rỗng trên bề mặt của hạt nguyên liệu dùng làm pha tĩnh
Thủ tính (Chiral)	Sự tương tác có tính lựa chọn xuyên lập thể phân giữa chất tan ở một dạng đối phân và nhóm chức có tính thủ tính được gắn vào pha tĩnh.
Ái lực (affinity)	Sự tương tác sinh học (sự gắn khớp vừa khít của một vị trí đặc trưng sinh học của chất tan) giữa chất tan với phối tử được giữ cố định trên pha tĩnh (nhóm các nguyên tử tạo nên một cấu trúc có kích cỡ vừa khớp)

Rất hiếm khi gặp trường hợp một loại sắc ký xảy ra chỉ với một loại hiện tượng, thí dụ hiện tượng hấp thu và hiện tượng phân chia. Thí dụ sắc ký cột hoặc sắc ký lớp mỏng xảy ra với hiện tượng chính là sự hấp thu nhưng không loại trừ có xảy ra hiện tượng phân chia; tương tự, sắc ký khí xảy ra với hiện tượng chính là hiện tượng phân chia nhưng đôi khi cũng có xảy ra hiện tượng hấp thu.

Phần trên trình bày cơ chế hoạt động của bốn kiểu sắc ký thường gặp trong các phòng thí nghiệm, ngoài ra để phục vụ cho việc cô lập nhiều loại

hợp chất hữu cơ đa dạng khác nhau (hợp chất hữu cơ sinh học, hợp chất có tính thủ tính...) các nhà khoa học đã có một số loại pha tĩnh khác với cơ chế lưu giữ chất khác, trình bày tóm tắt trong bảng 2 và trình bày kỹ hơn trong các chương tiếp theo.

1.3. Phân loại sắc ký theo cấu hình (chromatography configuration)

Các kỹ thuật sắc ký cũng được phân biệt dựa theo cấu hình, nghĩa là cho biết pha tĩnh được chứa đựng trong các thiết bị ra sao và với thiết bị như thế, pha động đi ngang qua pha tĩnh như thế nào, xét theo trạng thái vật lý (khí hoặc lỏng) hoặc cho biết làm sao pha động có thể di chuyển được (nhờ vào trọng lực, lực mao dẫn hoặc các lực khác).

Về tổng quát, có hai loại cấu hình: phương pháp phẳng (planar method) và phương pháp cột (column method).

Bảng 3: Tóm tắt các cấu hình sắc ký khác nhau.

Hình học	Cấu hình sắc ký	Chiều di chuyển của pha động	Loại sắc ký
Phẳng	Giấy	Đi lên; đi xuống; từ tâm lan tỏa tròn	Phân chia
Phẳng	Lớp mỏng	Đi lên; đi xuống; từ tâm lan tỏa tròn	Hấp thu, phân chia, trao đổi ion, lọc gel
Cột	Cột hở	Đi xuống	Hấp thu, phân chia, trao đổi ion, lọc gel
Cột	Sắc ký khí (GC)	Nhờ vào ngoại lực	Hấp thu, phân chia
Cột	HPLC	Nhờ vào ngoại lực	Hấp thu, phân chia, trao đổi ion, lọc gel

Trong những loại phương pháp phẳng: pha tĩnh được tráng thành một lớp thật mỏng lên trên một tấm phẳng. Khi sắc ký, tấm này được dựng đứng và pha động di chuyển ngang qua bề mặt của tấm này, có thể theo chiều từ trên xuống dưới (descending chromatography) hoặc từ dưới đi lên (ascending chromatography).

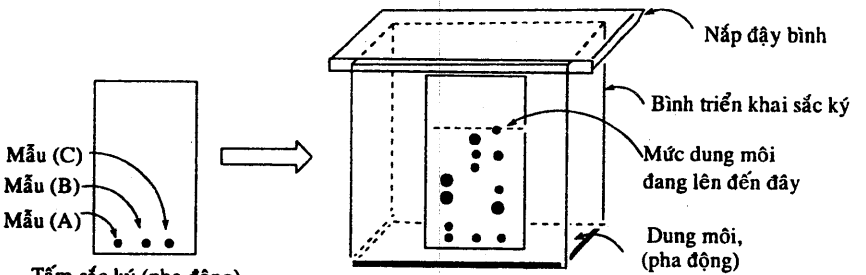
Trong những loại phương pháp cột: pha tĩnh được nén trong một trụ hình tròn và pha động di chuyển xuyên ngang qua trụ đó, có thể nhờ trọng lực hoặc nhờ một bơm có áp suất lớn hoặc nhờ áp lực của chất khí.

Tất cả các kỹ thuật sắc ký với pha động là chất lỏng (ngoại trừ sắc ký giấy, do sử dụng pha tĩnh là tấm giấy làm bằng cellulose không xử lý, nên quá trình xảy ra theo sắc ký phân chia),... đều có thể áp dụng tất cả các loại sắc ký đã trình bày ở phần trên thí dụ như: sắc ký hấp thu, trao đổi ion. Nếu pha động là chất khí, thí dụ sắc ký khí, sẽ giới hạn trong hai loại là sắc ký hấp thu và phân chia.

Bảng 3 tóm tắt các cấu hình sắc ký khác nhau.

1.3.1. Sắc ký giấy và sắc ký lớp mỏng (Paper and thin-layer chromatography)

Trong sắc ký giấy, pha tĩnh là một tờ giấy bằng cellulose thí dụ tờ giấy thấm, giấy lọc trong phòng thí nghiệm. Các loại giấy này có tính ái nước nên trên thực tế, pha tĩnh là một lớp nước (H_2O) thật mỏng đã được phủ che lên trên bề mặt của tờ giấy (một cách không chủ ý), chính vì thế sắc ký giấy là loại sắc ký phân chia. Pha động là chất lỏng.



Hình 6: Cấu hình phẳng của sắc ký lớp mỏng

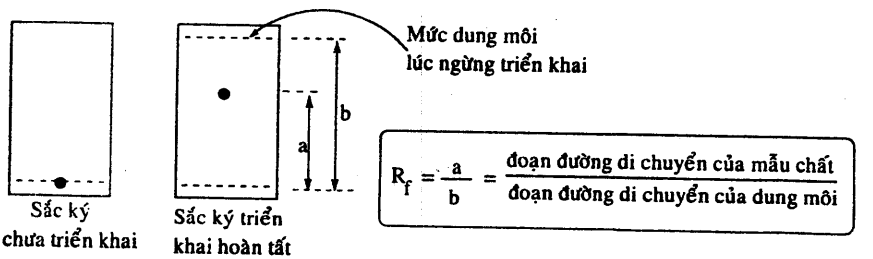
Trong sắc ký lớp mỏng, các nguyên liệu được sử dụng làm chất hấp thu được tráng thành một lớp mỏng, phủ đều lên trên bề mặt một tấm kiếng, tấm kim loại thường là nhôm hoặc tấm nhựa. Các tấm này là các sản phẩm thương mại hoặc có thể tự tráng lấy trong phòng thí nghiệm. Sắc ký lớp mỏng gồm đủ các loại sắc ký: hấp thu, phân chia, trao đổi ion, lọc gel. Chất hấp thu thông dụng trong sắc ký lớp mỏng là silica gel, là loại pha tĩnh với tính chất rất phân cực. Pha động luôn luôn là chất lỏng.

Trong sắc ký giấy và sắc ký lớp mỏng, kiểu triển khai sắc ký thông dụng nhất là pha động di chuyển từ dưới thấp lên trên cao, như trình bày trong hình 6.

Với một tấm sắc ký lớp mỏng, có thể khảo sát cùng lúc nhiều mẫu chất khác nhau (sắc ký lớp mỏng được trình bày chi tiết trong một chương riêng, ở phần sau).

Do phần lớn các hợp chất hữu cơ không có màu, nên không thấy vị trí của mẫu chất trong quá trình dung môi di chuyển đi lên trong bình triển khai, chỉ theo dõi mức dung môi gần đạt hết tấm sắc ký thì ngưng. Sử dụng các thuốc thử đặc trưng hoặc ánh sáng UV... (trình bày trong chương trên) để phun xịt lên tấm sắc ký, làm hiện hình các vết.

Với sắc ký lớp mỏng người ta sử dụng yếu tố làm chậm trễ (retardation factors), thường được gọi tắt là R_f, để phân tích định tính sự hiện diện của một loại hợp chất nào đó (so sánh với chất chuẩn).



1.3.2. Sắc ký cột hở cổ điển (Classical open-column chromatography) (Hình 7)

Sắc ký cột hở cổ điển là tên gọi để chỉ loại sắc ký sử dụng một ống hình trụ, được đặt dựng đứng, với đầu trên hở và đầu dưới có gắn một khoá, dụng cụ này giống như cái buret để định phân trong phòng thí nghiệm. Pha tĩnh rắn được nhồi vào ống trụ. Mẫu cần tách được đặt lên trên bề mặt của pha tĩnh. Pha động là dung môi được liên tục rót vào đầu cột. Nhờ trọng lực, dung môi di chuyển từ trên đầu cột xuống dưới cột, xuyên ngang qua pha tĩnh, rồi ra khỏi cột và được hứng trong những ống nghiệm, mỗi ống nghiệm với một thể tích như nhau. Nhờ thiết bị thu nhận mẫu tự động có thể hoạt động trong một thời gian dài, người ta có thể triển khai sắc ký cột để tự động qua đêm rất thuận tiện.

(Sắc ký cột được trình bày chi tiết trong phần sau).

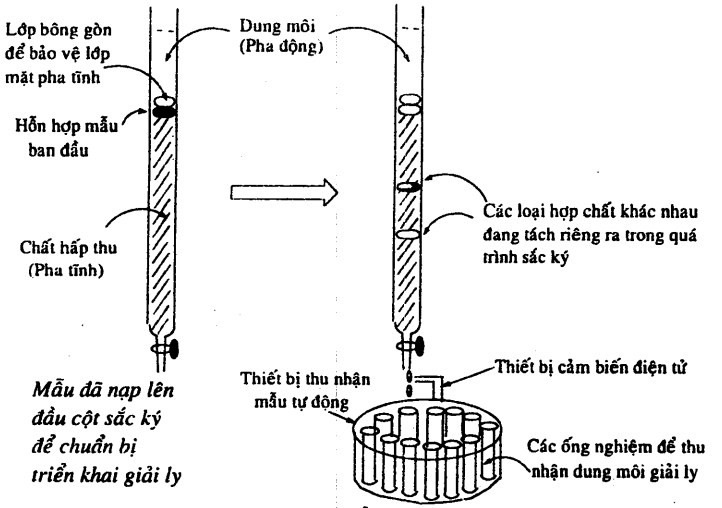
1.3.3. Sắc ký đồ (Instrumental chromatogram)

*a) **Thời gian lưu*** (retention time)

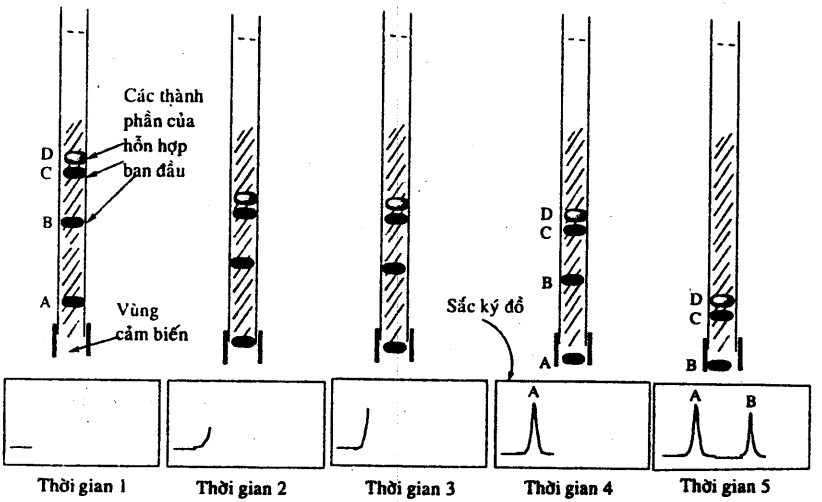
Với máy sắc ký khí và máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), pha tĩnh là bột rắn, nhuyễn cực mịn, được nén chặt trong một ống hình trụ, nên cần phải có một thiết bị tạo lực đẩy để giúp pha động di chuyển ngang qua pha tĩnh (không thể nhờ vào trọng lực như trường hợp sắc ký hở); ở đầu ra của cột sắc ký có gắn một thiết bị cảm biến điện tử để phát hiện biết khi nào có hợp chất đi ra khỏi cột (hỗn hợp mẫu ban đầu chứa nhiều thành phần khác nhau).

Thiết bị cảm biến thường được gọi là đầu dò (detector) tạo ra các tín hiệu điện tử để ghi thành sắc ký đồ (chromatogram). Sắc ký đồ có thể được vẽ trên màn hình máy tính hoặc trên máy ghi vẽ ra giấy.

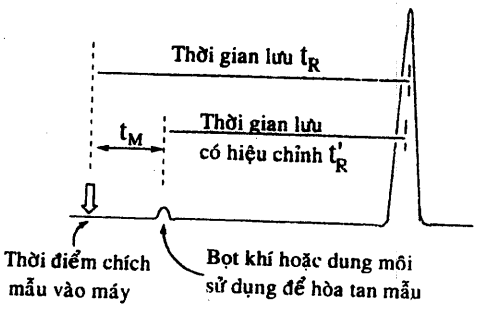
Hình 8 trình bày cho thấy máy ghi đã vẽ sắc ký đồ theo thời gian. Từ mẫu ban đầu là hỗn hợp gồm bốn hợp chất, nhờ quá trình sắc ký cột, các hợp chất này tách xa nhau ra và lần lượt được giải ly ra khỏi cột. Khi chất ra khỏi cột, đi vào vùng cảm biến (sensor field), máy sẽ phát hiện và ghi nhận thành sắc ký đồ.



Hình 7: Hệ thống sắc ký cột hở cổ điển với thiết bị thu nhận mẫu tự động



Hình 8: Biểu diễn nét vẽ trên sắc ký đồ tương ứng với lúc mẫu đi ra khỏi cột sắc ký theo thời gian và bị thiết bị cảm biến điện tử ghi nhận



$$t'_R = t_R - t_M$$

t_R : thời gian mà *hợp chất* bị giữ lại trong cột

t_M : thời gian của *hợp chất không bị cột giữ lại* (đó là dung môi đã sử dụng để hòa tan mẫu)

Hình 9: Cách xác định thời gian lưu bằng sắc ký đồ

Trong sắc ký khí và sắc ký lỏng hiệu năng cao, việc sử dụng sắc ký đồ để xác định sự hiện diện của một loại hợp chất nào đó có ý nghĩa giống nhau

Thời gian lưu, được viết tắt là t_R, *của một hợp chất là thời gian mà hợp chất đó bị giữ lại trong cột.* Trên sắc ký đồ, thời gian lưu là khoảng thời gian từ lúc chích dung dịch hợp chất vào máy cho đến lúc xuất hiện pic của hợp chất (tính tại tâm của pic).

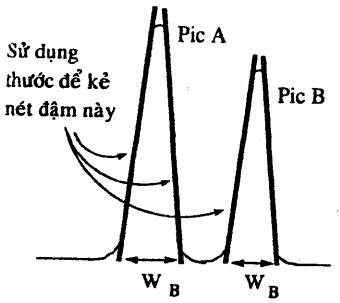
Người ta thường sử dụng một thông số khác là *thời gian lưu có hiệu chỉnh* (adjusted retention time), viết tắt là $t'_R = t_R - t_M$ trong đó t_M là thời gian của hợp chất không bị cột giữ lại, hợp chất đó là bọt khí hoặc dung môi đã sử dụng để hòa tan mẫu trước khi chích mẫu vào máy.

Có thể sử dụng thời gian lưu để biết được sự hiện diện của một hợp chất nào đó trong hỗn hợp, với điều kiện trước đó có mẫu chất tinh khiết để có thể ghi được t_R của nó trong cùng điều kiện ghi máy.

b) Độ phân giải (Resolution, R)

Từ sắc ký đồ, người ta biết được *độ phân giải*, ký hiệu bằng chữ R.

Độ phân giải của cột sắc ký cho biết cột có khả năng tách các chất riêng ra hay không, được định nghĩa là sự khác nhau về thời gian lưu của hai pic ở kề sát bên nhau chia cho giá trị trung bình của bề rộng của đáy của hai pic đó, minh họa trong hình 10.



Độ phân giải của cột $R = \dfrac{\left[t_R \text{ (pic B)} - t_R \text{ (pic A)} \right]}{\left[\dfrac{W_B \text{(pic A)} + W_B \text{(pic B)}}{2} \right]}$

Với

t_R (pic B) = Thời gian lưu của pic B

t_R (pic A) = Thời gian lưu của pic A

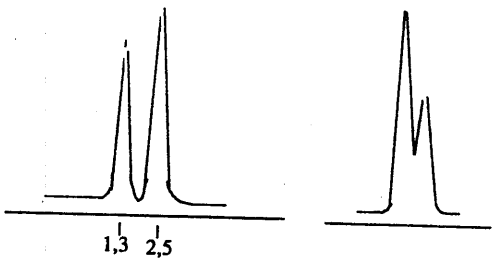
W_B(pic A) = Bề ngang tại đáy của pic A

W_B(pic B) = Bề ngang tại đáy của pic B

Hình 10: Cách đo bề rộng của đáy của một pic dùng để biết được khả năng phân giải R của một cột sắc ký

Thí dụ trong hình 11a: Hai pic của một sắc ký đồ có thời gian lưu lần lượt là 1,3 và 2,5 phút. Bề rộng đáy pic thứ nhất là 0,25 phút và của đáy pic thứ nhì là 0,29 phút, tính toán biết độ phân giải của cột R = 4,4. Theo lý thuyết, khi giá trị R > 1,5 cho biết cột đã tách tốt hai chất đó. Hình 11 b cho thấy cột đã không thể tách hai chất này.

$$R = \frac{t_R\text{(pic B)} - t_R\text{(pic A)}}{\dfrac{W_B\text{(pic A)} + W_B\text{(pic B)}}{2}} = \frac{(2,5 - 1,3)}{\dfrac{(0,25 + 0,29)}{2}} = 4,4$$



Hình a

Hình b

Hình 11: Thí dụ về độ phân giải R

2. CÁC LOẠI PHA TĨNH SỬ DỤNG TRONG SẮC KÝ

Có nhiều loại chất hấp thu sử dụng cho các loại sắc ký: silica gel, alumina.... Silica gel được sử dụng phổ biến nhất, còn alumina thường được lựa chọn nhờ vào tính base của nó, nên được sử dụng để tách các hợp chất có tính acid.

2.1. Silica gel

2.1.1. Silica gel pha thường

Silica gel làm pha tĩnh trong sắc ký được chế tạo bằng cách thủy giải silicat natri (cho tác dụng với acid sulfuric) để thành acid polysilisic, tiếp theo là sự ngưng tụ và polymer hóa để đạt các chỉ tiêu vật lý cần thiết như có các hạt với kích cỡ hạt, thể tích lỗ rỗng trên bề mặt, diện tích bề mặt.. như yêu cầu.

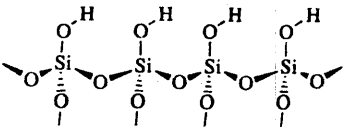
Các nhà sản xuất có thể trộn thêm các chất làm bám dính để silica gel có thể bám dính lên tấm bản mỏng (loại dùng để tráng bản mỏng). Tiếp vĩ ngữ "G" được sử dụng thống nhất trên thế giới để cho biết rằng silica gel đó đã có trộn thêm khoảng 10 % (w/w) chất kết dính [$CaSO_4$, (0,5 H_2O)]. Các nghiên cứu cho thấy sự hiện diện của các ion calci không làm ảnh hưởng đến khả năng tách chất của silica gel.

Cũng có thể hiệu chỉnh tính hấp thu của silica gel bằng cách cho silica gel kết hợp với những hợp chất khác như các base, các dung dịch đệm ở mức pH xác định. Cũng có thể thêm nitrat bạc để làm gia tăng khả năng tách các hợp chất, nhất là các alcen.

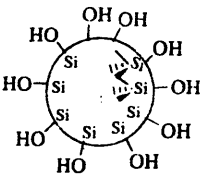
Silica gel là polymer ba chiều của những đơn vị tứ diện oxyd silicon SiO_2, H_2O và trên bề mặt hạt gel có những lỗ rỗng. Hạt silica gel sử dụng cho sắc ký cột cổ điển có đường kính hạt trung bình khoảng 40-200 μm, các lỗ rỗng có đường kính trung bình khoảng 40-300Å, diện tích bề mặt khoảng 100-800 m^2/g. Loại silica gel dùng cho sắc ký lớp mỏng có đường kính hạt khoảng 5-25 μm, đường kính lỗ rỗng 6 nm, nên đã tạo ra một phần tính chất đuổi các hợp chất có trọng lượng phân tử trong khoảng 500-1000 Dalton. Hạt silica gel dùng cho loại sắc ký cột HPLC chỉ để định tính, có diện tích bề mặt 200-500 m^2/g, có kích thước nhỏ 2 - 8 μm. Hạt silica gel HPLC để cô lập hợp chất, có diện tích bề mặt 500-800 m^2/g, có kích thước lớn hơn 40-60 μm.

Các vị trí hoạt động trên bề mặt của hạt silica gel là các nhóm silanol, mỗi nhóm cách nhau 5Å. Muốn điều chỉnh hoạt tính của bề mặt silica gel chỉ cần thêm hoặc loại bớt nước. Khi silica gel hấp thu nước, các phân tử nước sẽ che khuất những vị trí hoạt động trên bề mặt của hạt silica gel làm hạt bị giảm hoạt tính; muốn silica gel tăng hoạt tính trở lại, chỉ cần đun nóng để loại

bỏ nước. Đây là quá trình thuận nghịch, muốn làm giảm hoạt silica gel thì chỉ cần cho thêm nước vào. Tuy nhiên, khi đun nóng khoảng 400-500°C, quá trình thuận nghịch biến mất, silica gel bị mất vĩnh viễn hoạt tính bề mặt, do hai nhóm silanol kề bên đã bị mất một phân tử nước, tạo thành nối eter, không còn hoạt tính sắc ký.



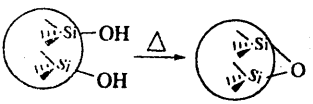
Cấu trúc mạng silica gel



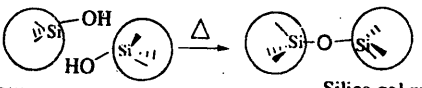
Silica gel

Hình 12: Mô tả bề mặt hạt silica gel

Hoạt tính của silica gel là khả năng hấp thu nước, được đo bởi số Brockmann. Silica gel có số Brockmann càng lớn thì bề mặt càng kém hoạt tính.



Silica gel hạt to — Silica gel mất hoạt tính



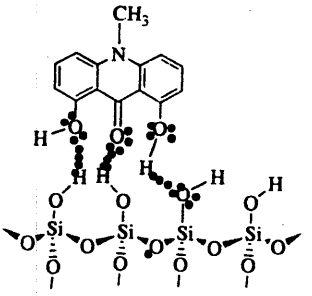
Silica gel hạt nhỏ — Silica gel mất hoạt tính

Bản chất hóa học của bề mặt hạt silica gel là những nhóm silanol –OH; đây là những tâm rất hoạt động có thể tạo nối hydrogen mạnh với những hợp chất được sắc ký. Vì thế, khi sắc ký cột với cột nhồi bằng silica gel, những hợp chất phân cực (có mang các nhóm chức –OH, NH_2, –COOH..) có khả năng tạo nối hydrogen mạnh, bị silica gel giữ chặt lại trong cột và bị giải ly ra muộn hơn so với những chất khác có tính kém phân cực như alcan, terpen (là những hợp chất không chứa những những nhóm chức có thể tạo nên nối hydrogen) ít bị silica giữ lại, sẽ ra khỏi cột sớm.

Tuy nhiên cũng cần nhớ là với một hợp chất nào đó đang bị silica gel giữ lại trong cột, giải ly chất đó ra khỏi cột được hay không cũng còn tuỳ vào việc sử dụng dung môi giải ly có độ phân cực mạnh hay yếu. Dung môi nào có thể tạo nối hydrogen mạnh sẽ là dung môi thích hợp để giải ly các hợp chất phân cực mạnh ra khỏi cột silica gel. Metanol thường được chọn để đuổi hết các chất còn sót lại trong cột silica gel. Hơn nữa, muốn đuổi hết các hợp

chất phân cực thí dụ các flavonoid glycosid, triterpen glycosid nên dùng 1-2% acid acetic trong metanol.

Tạo nối hydrogen giữa chất tan và silica gel



Lưu ý rằng khi sử dụng dung môi là metanol hoặc nước, hai loại dung môi này có thể hòa tan một lượng nhỏ silica gel khiến cho dung dịch giải ly hứng được có chứa một ít silica gel, gây hiểu lầm rằng đó là hợp chất thu được. Silica gel dễ dàng hòa tan trong nước có pH nhỏ hơn 7.

2.1.2. Silica gel chế hóa

Silica gel có thể được chế hóa bằng cách cho các nhóm chức silanol của silica tác dụng với nhiều loại clorur silil khác nhau để tạo thành những loại chất hấp thu mới, với các đặc tính vật lý đổi khác, được gọi là silica gel-tạo nối (bonded silica gel). Có thể chế hóa thành silica gel-tạo nối dùng cho pha thường hoặc pha đảo.

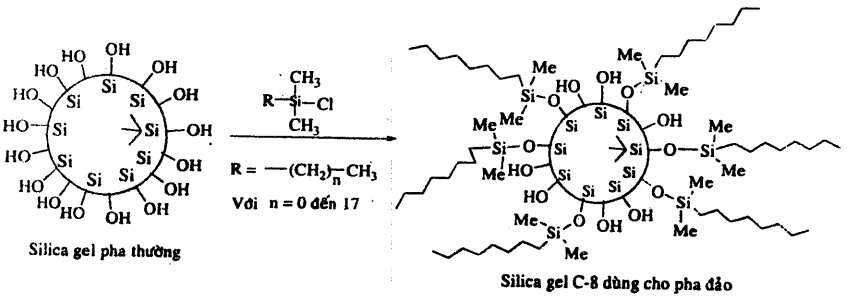
a) Silica gel-tạo nối dùng cho pha đảo

Cho silica gel tác dụng với clorodimetylalkylsilan R-Si$(CH_3)_2$-Cl để biến đổi silica gel này thành loại chất hấp thu mới có tính không phân cực. Dây alkyl R có thể là C-1, C-2, C-4, C-6, C-8 và C-18, tuy nhiên, người ta thường hay chế tạo dây C-8 và C-18 (Hình 13).

Trong các loại silica gel thương phẩm, 40 - 60% các nhóm silanol bị biến thành các dẫn xuất. Các loại silica gel này rất bền, chịu được dung môi ở áp suất 6000 psi (41,4 MPa) trong khoảng pH 2,0 – 8,5. Một vài loại dẫn xuất như polystyrene, divinylbenzen còn bền hơn cả silica gel C-18, chịu được khoảng pH 1,0 – 13,0.

Loại silica gel pha đảo có tính kém phân cực, nên có ái lực mạnh với các hợp chất kém phân cực, giữ chặt các hợp chất này lại trong cột. Pha động thường là nước. Bên cạnh dung môi nước, người ta thêm vào những dung môi hữu cơ như metanol, acetonitril, tetrahydrofuran với nồng độ tăng dần theo quá trình sắc ký (nghĩa là trong quá trình giải ly, dung môi giải ly càng lúc càng *kém phân cực*), như thế những hợp chất phân cực sẽ được giải ly ra khỏi cột trước và những chất kém phân cực sẽ ra sau.

Người ta thường hay thêm một tỉ lệ nhỏ 0,01 - 0,1% acid trifluoroacetic (TFA) vào pha động.



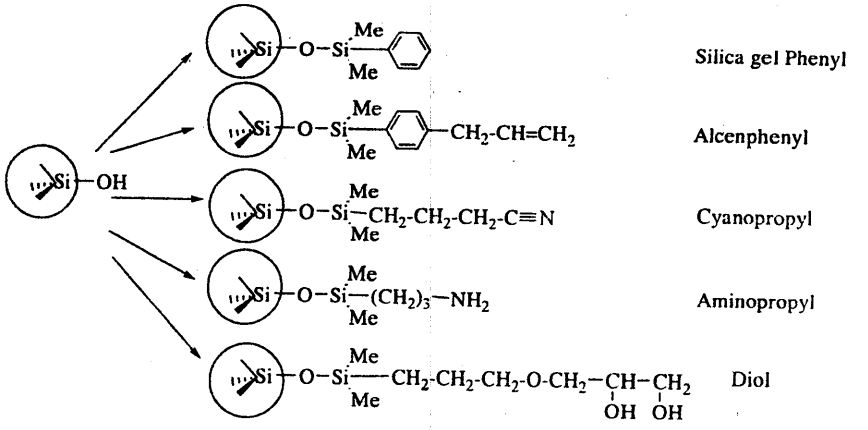
Hình 13: Cấu trúc của silica gel có tạo nối dùng cho pha đảo

b) Silica gel-tạo nối dùng cho pha thường

Các nhà sản xuất cũng điều chế loại silica gel chế hóa nhưng dùng cho pha thường. Thực hiện phản ứng điều chế tương tự như trên nhưng nhóm chức cuối dây thường là: phenyl, cyano, amino, diol.. (Hình 14).

So với silica gel thường, loại silica gel chế hóa có giá thành mắc hơn nhiều nhưng bù lại rất tốt, vì nó bền đối với tất cả các loại dung môi, kể cả những dung môi có tính phân cực mạnh, kể cả nước. Silica gel chế hóa có thể sử dụng với tất cả các loại dung môi từ không phân cực đến rất phân cực.

Ngoài ra, silica gel chế hóa còn có ưu điểm nữa là có thể sử dụng dung môi phân cực mạnh để giải ly ra khỏi cột tất cả các hợp chất có tính phân cực mạnh; trong khi đó, silica gel thường sẽ giữ rất mạnh các hợp chất có tính phân cực, nhiều khi hợp chất bị dính luôn trong cột, không thể giải ly ra khỏi cột.



Hình 14: Cấu trúc và tên gọi một số loại silica gel-tạo nối dùng cho pha thường

c) Silica gel-tạo nối dùng cho sắc ký thủ tính

Hoạt tính sinh học của những hợp chất thủ tính đặc trưng tùy theo hóa lập thể của chúng. Có đối phân có hoạt tính chữa bệnh trong khi đối phân còn lại không có dược tính đó, mà lại có khi còn độc hại, vì thế nhất thiết phải tách riêng chúng. Nhưng hai đối phân có đặc tính vật lý giống nhau, cùng độ hòa tan vào cùng một loại dung môi nào đó, nên không thể sử dụng sắc ký để tách chúng được, cho dù sử dụng silica gel pha thường hay pha đảo, cột thường hay cột hiệu năng cao HPLC.

Đã có nhiều loại silica gel thương phẩm sử dụng cho sắc ký thủ tính, với các cơ chế lưu giữ chất khác nhau, một số những chất đó sử dụng silica gel làm chất nền (bảng 3).

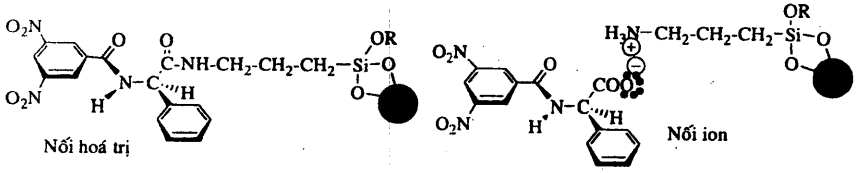
Bảng 3: Phân loại một vài pha tĩnh thủ tính.

Loại pha tĩnh thủ tính	Cơ chế bắt giữ chất của pha tĩnh
Pirkle	Tương tác qua ba điểm
Polymer hình xoắn ốc-thủ tính (polysacarid)	Các nối kỵ nước (hydrophobic bond)
Cyclodextrin và eter vòng (crown ether)	Tương tác giữa chủ-khách (tương tác giữa chất tan đối với lỗ rỗng có tính thủ tính của chủ là cyclodextrin)

Enzym bị giữ cố định (Immobilised enzymes)	Ái lực thủ tính
Phức amino acid kim loại	Phức xuyên lập thể phân

• ***Pha tĩnh Pirkle***

Tác giả Pirkle đã chế tạo pha tĩnh bằng cách cho một dẫn xuất amino acid có tính thủ tính là (*R*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoyl)phenylglycin gắn vào hạt aminopropylsilica có kích thước hạt 5 μm ngang qua một nối hóa trị hoặc bằng lực hút tĩnh điện giữa hai ion ngược dấu (Hình 15).

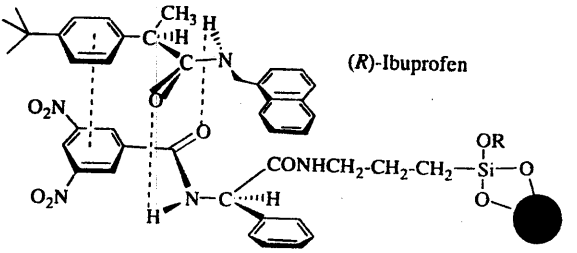


Hình 15: Pha tĩnh Pirkle dùng cho sắc ký thủ tính. Nhóm N-(3,5-dinitrobenzoyl)phenylglycin hoặc tạo nối hóa trị hoặc tạo nối ion vào aminopropylsilica

Để pha tĩnh Pirkle nhận diện một hợp chất thủ tính, chất này phải *có ít nhất* ba vị trí tương tác với pha tĩnh, trong đó phải có một vị trí phụ thuộc vào hóa lập thể. Các vị trí có thể xảy ra được sự tương tác là nhờ vào các yếu tố sau: sự cho và nhận điện tử π giữa những mảnh nhân thơm (π-donor, π-acceptor aromatic fragments); sự tạo nối hydrogen liên phân tử và sự hút lưỡng cực. Khi có ba điểm tương tác xảy ra, sẽ tạo nên một phức xuyên lập thể phân giữa pha tĩnh và chất thủ tính. Khi có ba điểm tương tác xảy ra, sẽ tạo nên một *phức xuyên lập thể phân* giữa pha tĩnh và chất thủ tính. Phức chất này được thành lập một cách thoáng qua, tạm thời và thuận nghịch.

Khả năng tách hai đối phân của pha tĩnh dựa vào sự khác biệt về năng lượng của cặp đối phân đối với pha tĩnh. Đối phân nào có những tương tác vừa khớp với pha tĩnh sẽ bị pha tĩnh giữ lại trong cột mạnh hơn, vì thế sẽ ra khỏi cột chậm so với đối phân kia. Thí dụ pha tĩnh đã giữ mạnh đối phân (*R*)-ibuprofen như minh họa trong hình 16.

Pha tĩnh Pirkle có sẵn nhiều vị trí có thể tạo tương tác với chất tan, nên cũng được sử dụng để tách các hỗn hợp hai đối phân của: alcol, diol của hợp chất thơm đa vòng, amino acid, hydroxyacid, diacylglycerol, các hợp chất dị vòng thủ tính....



Hình 16: Có ít nhất ba vị trí tương tác giữa pha tĩnh Pirkle và dẫn xuất amid của hợp chất (R)-ibuprofen

- ***Cột protein cố định***

Pha tĩnh thủ tính vẫn là chất nền silica gel. Người ta cố định (immobilised) các hợp chất peptid-thiên nhiên-thủ tính, thí dụ như bovin serum albumin, acid α_1-glycoprotein, ovomucoid, chymotrypsin... lên chất nền silica gel, ngang qua một dây hydrocarbon trung gian (spacer).

2.2. Alumina

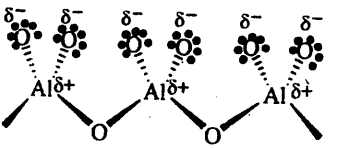
Alumina là oxid aluminium Al_2O_3, được điều chế với qui trình tương tự như silica gel nhưng trên nguyên liệu là hydroxid aluminium, hơn thế nữa có thể điều chỉnh độ pH của dung dịch phản ứng để sản xuất ra hạt alumina với bề mặt có tính acid, tính kiềm hay trung tính. Nhiệt độ lúc hoạt hóa trong quá trình điều chế là đặc điểm khác nhau giữa alumina với silica gel. Muốn có alumina hoạt tính mạnh, cần phải đun nóng alumina ở 400-450°C trong 12-16 giờ. Muốn làm giảm hoạt alumina, thêm nước vào.

Tương tự như silica gel, hoạt độ của alumina được đo bởi số Brockmann. Alumina hoạt độ I: đun nóng alumina ở 400-450°C trong 12-16 giờ. Alumina hoạt độ II khi thêm 3% nước vào alumina hoạt độ I; thêm 6% thành hoạt độ III; thêm 10% thành hoạt độ IV; thêm 15% thành hoạt độ V. (Xem thêm chương sắc ký lớp mỏng để biết cách thử để biết hoạt độ của pha tĩnh).

Để làm nguyên liệu cho pha tĩnh, người ta thường sử dụng alumina trung tính, có hoặc không trộn thêm chất kết dính.

Bề mặt của alumina có thể tạo ra nhiều kiểu tương tác khác nhau giữa pha tĩnh với chất tan. Thứ nhất, chung quanh Al^{3+} là một vùng dương điện mạnh nên có thể gây ra sự tương tác với các hợp chất nào *có khả năng phân ly mạnh* (polarisable), nên alumina được dùng hơn so với silica như là pha tĩnh để tách hỗn hợp gồm các hợp chất thơm và các alcen. Các alcen có khả năng phân ly mạnh hơn hợp chất thơm nên alumina tương tác mạnh với alcen nên giữ alcen trong cột lâu hơn. Thứ nhì, các vị trí mang tính kiềm như O^{2-} sẽ cho tương tác với hợp chất có thể *cho proton*.

Một phần của cấu trúc alumina



Alumina là chất hấp thu mạnh và có thể hoạt động như ion lưỡng cực, tuỳ theo tính chất của dung môi giải ly và bề mặt của hạt alumina. Thí dụ alumina kiềm thường được sử dụng để tách các hợp chất có tính kiềm như các hợp chất alcaloid. Alumina trung tính thường sử dụng nhiều hơn, để tách những hợp chất tương đối không phân cực, thí dụ các steroid. Alumina acid thường được sử dụng để tách các hợp chất có tính acid thí dụ các acid carboxilic.

Các hợp chất có tính kiềm, nhạy cảm với tính kiềm, có khuynh hướng giảm cấp trong quá trình sắc ký cột sử dụng alumin. Từ lâu, alumin không còn được sử dụng một cách thường xuyên. Alumin tính acid có thể gây ra sự khử nước các hợp chất alcol tam cấp; alumina tính base có thể gây ra sự thủy giải nhóm ester, xúc tác phản ứng aldol hóa, ngoài ra có thể làm dịch chuyển nối đôi, mở rộng vòng ...

2.3. Kieselguhr - Celite

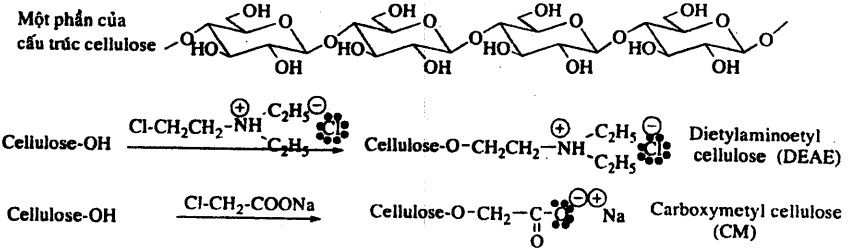
Kieselguhr và Celite là loại đất sét diatomit. Nguyên liệu này có các lỗ rỗng lớn, diện tích bề mặt lớn và có tính hấp thu rất yếu. Khả năng hấp thu còn có thể giảm hơn nữa bằng cách cho tác dụng với dung dịch HCl 3%, rửa

cho sạch clor và sấy khô ở 80°C. Với các tính chất trên, nó được sử dụng làm pha tĩnh trong sắc ký phân chia.

Nếu được sử dụng cho sắc ký lớp mỏng, nó thường được trộn thêm khoảng 15% (w/w) chất kết dính.

2.4. Bột giấy

Với sắc ký giấy, thật tiện lợi khi sử dụng tờ giấy lọc để làm pha tĩnh, nhưng việc sử dụng trực tiếp có nhiều nhược điểm. Trong giấy, cellulose ở dạng những sợi dài nằm song song kề nhau một cách tự nhiên, và một hệ thống mạng như thế chắc chắn sẽ có các lỗ hỗng. Khi dung môi giải ly di chuyển (mang theo các chất tan, solute) dọc theo bề mặt của sợi, các lỗ rỗng này sẽ được dịp phủ đầy dung môi, và các chất tan sẽ có dịp khuếch tán vào lỗ rỗng này, khiến cho vết của chất tan càng lúc càng to dần so với vết chấm tại mức xuất phát ban đầu. Còn nếu sợi cellulose được nén quá chặt, dòng chảy rất khó di chuyển.



Hình 17: Cấu trúc hóa học của cellulose và các loại dẫn xuất của cellulose làm pha tĩnh trong sắc ký trao đổi ion (anion hoặc cation)

Ngược lại, nếu pha tĩnh được làm bằng bột giấy, các hạt bột giấy nhuyễn mịn và có cùng kích thước sẽ tạo nên pha tĩnh đồng nhất nên pha động di chuyển dễ dàng hơn và chất tan sẽ không lan rộng trên bề mặt của pha tĩnh.

Trên bề mặt của cellulose có các phân tử nước, là do glucopyranose cua cellulose tạo nối hydrogen với các phân tử nước, vì thế quá trình tách các chất xảy ra theo cơ chế sắc ký phân chia. Pha tĩnh là cellulose được sử dụng để tách các chất ưa nước thí dụ như các amino acid, đường...

Nhiều loại dẫn xuất của cellulose đã được sản xuất để phục vụ loại sắc ký trao đổi ion.

• Dietylaminoetyl cellulose (DEAE), chất trao đổi anion: khi cellulose tác dụng với hydroclorur 2-cloro-1-dietylaminoetyl tạo thành dẫn xuất dietylaminoetyl cellulose, gọi tắt là DEAE. Resin DEAE mang điện tích dương, là chất trao đổi anion mạnh, được sử dụng làm pha tĩnh trong sắc ký trao đổi anion. Các hợp chất nào có mang điện tích âm sẽ bị resin này bắt giữ lại trong cột, còn những loại phân tử khác không mang điện tích hoặc mang điện tích dương, sẽ đi ngang qua resin một cách bình thường và ra khỏi cột. Sau khi loại bỏ hết tất cả các hợp chất không mang điện tích hoặc mang điện tích dương, người ta thay đổi điều kiện giải ly để giải phóng hợp chất mang điện tích âm ra khỏi cột, để cô lập riêng hợp chất này (Trình bày chi tiết ở chương sắc ký trao đổi ion).

• Carboxymetyl cellulose (CM), chất trao đổi cation: Khi cho cellulose tác dụng với acid monocloroacetic sẽ tạo thành dẫn xuất carboxymetyl cellulose, gọi tắt là CM. Resin CM mang điện tích âm, là chất trao đổi cation yếu, được sử dụng làm pha tĩnh trong sắc ký trao đổi cation. Các hợp chất có mang điện tích dương sẽ bị resin này bắt giữ lại trong cột.

2.5. Gel

Gel là tên gọi chung cho các loại pha tĩnh được điều chế từ tinh bột, agar (polysaccarid) hoặc polyacrylamid, trong đó các chuỗi dây dài được nối mạng ngang để tạo thành mạng không gian ba chiều. Gel thường được sử dụng trong sắc ký cột hoặc điện di (electrophoresis). Nhiều nhà sản xuất đã đưa ra các sản phẩm thương mại với tên gọi khác nhau.

2.5.1. Polyacrylamid (Gel Bio-Gel loại P)

Nhà sản xuất Bio-Rad có sản xuất loại gel polyacrylamid đặt tên là Bio-Gel P.

Polyacrylamid là loại polymer tổng hợp, là những hạt hình cầu, được chế tạo từ acrylamid (CH_2=CH-$CONH_2$) với *N,N*-metylenbisacrylamid. Có thể điều chỉnh kích thước của lỗ rỗng lớn nhỏ khác nhau bằng cách thay đổi tỉ

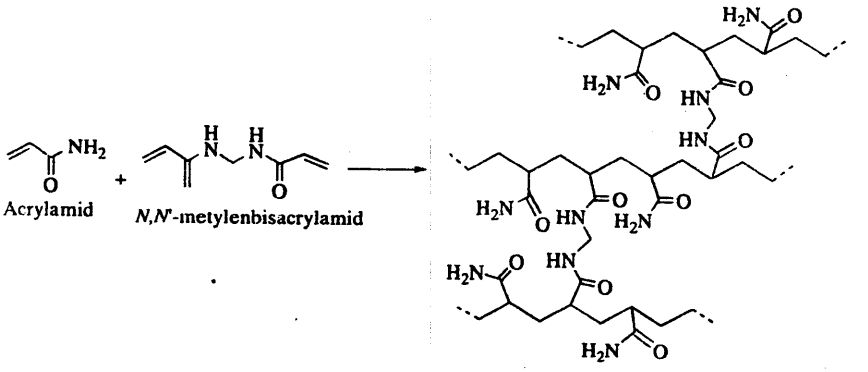
lệ của hai cấu phần monomer nêu trên. Hạt gel có kích thước trung bình 45-180 μm.

Bảng 4: Các loại gel Bio-Gel.

Tên thương mại của gel	Gel thích hợp để tách các hợp chất có trọng lượng phân tử (đơn vị C)	Thể tích gel trương nở trong nước (ml /g gel khô)
P-2	100 -2.000	3
P-4	800 – 4.000	4
P-6	1.000 –6.000	6,5
P-10	1.500 - 20.000	7,5

Gel tương đối trơ, nhưng kém bền so với Sephadex, trong môi trường kiềm mạnh các nối amid sẽ bị thủy giải thành acid carboxylic. Giống như gel dextran, gel polyacrylamid có tính chất ái nước cực mạnh (hydrophilic). Hạt gel trương nở trong nước (bảng 4) và pha động hầu như luôn luôn là nước. Để gia tăng thêm khả năng hòa tan mẫu, có thể cho thêm etanol hoặc metanol (thêm đến 20% v/v).

Loại tương tác trong sắc ký này có liên quan đến nối hydrogen. Loại sắc ký này được sử dụng để tách các hợp chất carbohydrat, peptid, tanin....



Hình 18: Một phần cấu trúc của gel polyacrylamid

2.5.2. Gel dextran

Hãng sản xuất Pharmacia, Thụy Điển, đã sản xuất loại gel dextran có tên thương mại là Sephadex G. Gel dextran là polyglucose trong đó các đơn vị glucose nối với nhau bằng nối α-1,6 tạo thành dây dài (gọi là dextran); các dây dài này được nối mạng ngang bởi epiclorohydrin, tạo thành polymer rắn, không tan trong nước. Nếu thay đổi tỉ lệ của dextran và epiclorohydrin có thể điều chế ra nhiều loại gel Sephadex có lỗ rỗng lớn nhỏ khác nhau, rất thích hợp để làm pha tĩnh cho sắc ký lọc gel.

Gel Sephadex không tan trong nước; bền với tất cả các loại dung môi hữu cơ (tuy có trương nở nhẹ trong dung môi hữu cơ kém phân cực), với nước, nước muối, dung dịch acid hoặc kiềm trong khoảng pH = 2 -12. Trong môi trường acid mạnh, các nối glycosid có thể bị thủy giải. Một ưu điểm nữa là cột nhồi sắc ký có thể sử dụng nhiều lần mà không cần phải tái tạo lại gel. Nhược điểm của gel đã trương nở là có thể bị những vi sinh vật tấn công làm hư hại.

Loại gel polysaccarid bền với tất cả các loại dung môi ngoại trừ acid mạnh có thể làm thủy giải nối glycosid. Ngoài việc gel trương nở trong nước, gel cũng có thể trương nở trong dung môi hữu cơ như dimetylformamid (DMF), dimetylsulfoxid (DMSO), etylen glycol, hỗn hợp nước-metanol.

Bảng 5: Các loại gel Sephadex loại G.

Loại gel Sephadex	Gel thích hợp để tách các hợp chất có trọng lượng phân tử (đơn vị C)	Thể tích gel trương nở trong *nước* (ml /g gel khô)
G -10	0 – 700	2,5
G -15	0 – 1.500	3
G -25	100 – 5.000	5
G -50	500 – 10.000	10
G -100	1.000 – 100.000	15
LH -20	100 – 4.000	

Trong gel Sephadex loại G, các con số ghi phía sau chữ G biểu diễn số lượng nước mà gel khô sẽ hút để trương nở. Thí dụ: Sephadex G-15 nghĩa là 1g gel khô sẽ cần 3 ml nước để trương nở. Các loại gel và khả năng hút nước

được trình bày trong bảng 5.

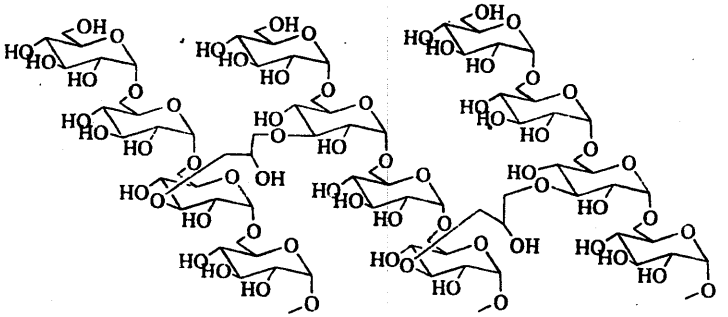
Các loại gel có độ tạo mạng ngang lớn (nên có lỗ rỗng nhỏ) như Sephadex G-10 và G-15 rất thường được dùng để tách những hợp chất tự nhiên. Gel trương nở rất phù hợp để tách những hợp chất tự nhiên tan trong nước như carbohydrat hoặc các peptid dây ngắn. Cơ chế chủ yếu để tách các hợp chất là theo kiểu sắc ký lọc gel.

Các nghiên cứu trên loại gel Sephadex cho thấy quá trình sắc ký có thể xảy ra theo ba loại cơ chế.

* *Theo cơ chế sắc ký phân chia* khi nạp gel trương nở vào cột và giải lỷ bởi hỗn hợp dung môi. Nên sử dụng hỗn hợp dung môi phân cực và không phân cực.

* *Theo cơ chế sắc ký hấp thu* khi hỗn hợp chất cần tách có chứa các hợp chất phenol và dị vòng. Gel Sephadex có ái lực một cách bất thường đối với các hợp chất phenol và dị vòng nên giữ chặt các loại hợp chất này trong cột hơn so với các loại hợp chất khác.

* *Theo cơ chế sắc ký lọc gel* khi nạp gel trương nở vào cột và giải ly bởi *một loại dung môi.*



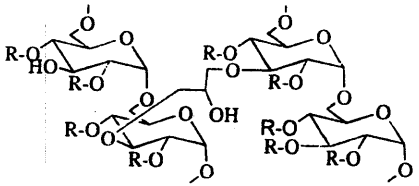
Hình 19: Cấu trúc hóa học của gel Sephadex G

a) Sephadex LH-20

Gel Sephadex LH-20 chính là Sephadex G-25 trong đó các nhóm –OH được biến đổi thành hydroxypropyl eter. Việc điều chế dẫn xuất này giúp cho gel có thêm tính thân dầu (lipophilicity) bên cạnh tính ái nước (hydrophilicity) sẵn có.

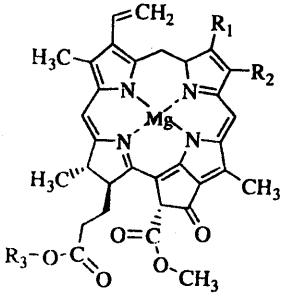
Một phần của gel Sephadex LH-20

(với R = $-CH_2CH_2CH_2OH$)



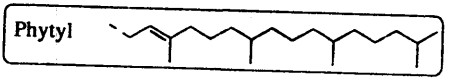
Bên cạnh việc gel trương nở trong nước, gel có thể trương nở trong dung môi hữu cơ có tính phân cực như dimetylsulfoxid, pyridin, dimetylformamid, metanol, tetrahydrofuran... (trong dung môi hữu cơ, gel nở khoảng gấp 4 lần thể tích lúc khô).

Gel LH-20 tách các hợp chất theo trọng lượng phân tử với những hợp chất có trọng lượng phân tử khoảng 100 - 4.000 dalton. Những hợp chất có trọng lượng phân tử khoảng 4.000 dalton, thường không bị gel giữ lại trong cột, nên ra khỏi cột ở thể tích chết của cột (void volume).



Cấu trúc hoá học của một số clorophyl

Clorophyl a	Clorophyl b	Clorophyl c 1
$R_1 = CH_3$	$R_1 = CHO$	$R_1 = COO\text{-}CH_3$
$R_2 = C_2H_5$	$R_2 = C_2H_5$	$R_2 = =CH\text{=}CH_2$
R_3 = Phytyl	R_3 = Phytyl	R_3 = Phytyl



Trong hóa học các hợp chất tự nhiên, các loại cao chiết từ cây cỏ thường chứa nhiều tạp chất, thường nhất là các diệp lục tố (clorophyl a,b...). Các hợp chất này gây nhiều khó khăn cho quá trình cô lập tinh sạch các hợp chất hữu cơ. Các clorophyl thường có trọng lượng phân tử tương đối lớn hơn nhiều so với phần lớn những hợp chất hữu cơ thông thường hay gặp trong cây

cỏ (clorophyl a, $C_{55}H_{72}MgN_4O_5$, M = 893,51; clorophyl b, $C_{55}H_{70}MgN_4O_6$, M = 907,49) nên nếu muốn loại bỏ các hợp chất này, người ta thường sử dụng Gel LH-20.

Nạp gel LH-20 trương nở vào cột, nạp mẫu cần tách lên đầu cột, giải ly bởi một loại dung môi. Clorophyl và những hợp chất có trọng lượng phân tử lớn, ra khỏi cột trước, các hợp chất hữu cơ ra sau.

b) Gel Sephadex sắc ký trao đổi ion

Gel Sephadex sắc ký trao đổi ion là gel dextran trong đó các nhóm –OH được biến đổi thành eter –OR với R là các nhóm chức mang điện tích dương hoặc âm. Một vài loại gel Sephadex sắc ký trao đổi ion được trình bày trong bảng 6.

Bảng 6: Một số loại gel thương mại Gel Sephadex sắc ký trao đổi ion.

Tên	Loại	Nhóm chức hoạt động	Khả năng trao đổi mmol H^+ (OH^-). g^{-1}
Sephadex-SP	Acid mạnh	Sulphopropyl (-SO_3^-)	2,3
Sephadex-CM	Acid yếu	Carboxymetyl	4,5
Sephadex-QAE	Base mạnh	Dietyl-(2-hydroxypropyl) aminoetyl	3,0
Sephadex-DEAE	Base yếu	Dietylaminoetyl	3,5
Agarose-DEAE	Base yếu	Dietylaminoetyl	1,5
Agarose-CM	Acid yếu	Carboxymetyl	2,5
Sephacel-DEAE	Base yếu	Dietylaminoetyl trên cellulose	1,4

3. SẮC KÝ CỘT HỞ (OPEN-COLUMN CHROMATOGRAPHY)

Sắc ký cột hở được tiến hành ở điều kiện áp suất khí quyển. Pha tĩnh thường là những hạt có kích thước tương đối lớn (50-150 μm), được nạp trong một cột bằng thủy tinh. Mẫu chất cần phân tách được đặt ở phần trên đầu cột, phía trên pha tĩnh (có một lớp bông thủy tinh che chở để lớp mặt không bị xáo trộn), bình chứa dung môi giải ly được đặt phía trên cao. Dung môi giải ly ra khỏi cột ở phần bên dưới cột, được hứng vào những lọ nhỏ đặt ngay ống

dẫn ra của cột. Hệ thống như thế thường làm cho sự tách chậm, hiệu quả thấp so với sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Tuy vậy, sắc ký cột hở cũng có ưu điểm như pha tĩnh và các dụng cụ thí nghiệm rẻ tiền, dễ kiếm; có thể triển khai với một lượng lớn mẫu chất.

3.1. Lựa chọn chất hấp thu và dung môi để khởi đầu giải ly

Trong loại sắc ký cột với pha tĩnh là silica gel loại thường, hợp chất không phân cực được giải ly khỏi cột trước, hợp chất phân cực được giải ly sau.

Với hai phân tử không phân cực, phân tử có trọng lượng phân tử lớn sẽ có tính phân cực mạnh hơn phân tử kia, nó bị pha tĩnh giữ lại trong cột nên di chuyển ra khỏi cột chậm hơn so với phân tử nhỏ, và cũng có khi nó còn ở lại lâu trong cột hơn so với vài phân tử tuy có tính phân cực nhưng có trọng lượng phân tử nhỏ.

Các loại hợp chất có tính phân cực tăng dần được trình bày trong bảng 7.

Bảng 7: Các loại hợp chất có tính phân cực tăng dần.

Loại hợp chất	Thứ tự giải ly ra khỏi cột
Hydrocarbon	Nhanh, với dung môi không phân cực
Alcen	↓
Eter	↓
Halocarbon R-X	↓
Hợp chất thơm	↓ Thứ tự giải ly
Ceton	↓ ra khỏi cột
Aldehyd	↓
Ester	↓
Alcol	↓
Amin	↓
Acid carboxylic	↓
Các hợp chất kiềm mạnh	Chậm nhất, cần dung môi phân cực

3.1.1. Chọn chất hấp thu để nhồi cột

Chọn một cách độc đoán tùy thuộc vào tính phân cực của mẫu chất cần phân tích. Với những hợp chất rất phân cực, nên sử dụng sắc ký trao đổi ion hoặc sắc ký lọc gel. Còn bình thường thì sử dụng sắc ký hấp thu.

3.1.2. Chọn dung môi bắt đầu cho quá trình sắc ký cột

Trước khi triển khai sắc ký cột, nhất thiết phải sử dụng sắc ký lớp mỏng để dò tìm hệ dung môi giải ly cho phù hợp, với các bước tuần tự như sau:

• Bước 1: Mẫu cần sắc ký được hòa tan hoàn toàn trong dung môi phù hợp, với nồng độ 10 mg/ml, gọi là dung dịch mẫu (A).

• Bước 2: Chuẩn bị 4-6 tấm bản mỏng 2,5 x 10 cm. Chấm lên những tấm bản này, mỗi tấm một chấm khoảng 2 -5µl dung dịch (A).

• Bước 3: Mỗi bản mỏng được triển khai với một loại dung môi dung ly khác nhau, kế đó hiện hình các vết trên bản bằng đèn UV hoặc bằng các thuốc thử. Với đơn dung môi sẽ dễ dàng thấy được dung môi nào là phù hợp. Từ kết quả đó, cố gắng tìm một hỗn hợp dung môi, trong đó một dung môi kém phân cực và một dung môi phân cực, thí dụ eter dầu hỏa: etyl acetat.

• Bước 4:

* Với hỗn hợp mẫu chất là kết quả của một phản ứng tổng hợp hữu cơ (hỗn hợp chứa 2 - 3 hợp chất), hãy chọn hệ dung môi nào mà có thể đẩy ***hợp chất cần quan tâm*** lên ở vị trí trên bản với Rf = 0,2 - 0,3.

* Đối với mẫu cao thô chiết xuất từ cây cỏ (cao có chứa nhiều hợp chất từ không phân cực đến rất phân cực), chọn dung môi giải ly đầu tiên là dung môi có thể đẩy ***vết ít phân cực nhất*** của cao chiết, lên vị trí ở bản với Rf = 0,5 và chọn dung môi chấm dứt sắc ký cột là dung môi có thể đẩy ***vết phân cực nhất*** của cao chiết, lên vị trí ở bản với Rf = 0,2.

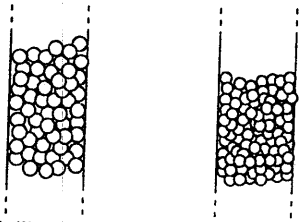
Sau khi chọn được hệ dung môi phù hợp, có thể áp dụng hệ dung môi này cho sắc ký cột. Giải ly trước tiên bằng dung môi không phân cực và tăng dần tính phân cực cho dung môi giải ly.

Lưu ý:

✳ Phải sử dụng pha tĩnh của sắc ký lớp mỏng và của sắc ký cột giống nhau.

✳ Dung môi để giải ly cột là hệ dung môi đã chọn trong phần thực nghiệm nêu trên, nhưng phải chỉnh tỉ lệ dung môi sao cho có *tính kém phân cực một ít* so với hệ dung môi đã chọn. Bởi vì chất hấp thu, thí dụ silica gel, tráng trên bản mỏng là loại silica gel dùng cho sắc ký lớp mỏng, với cỡ hạt nhuyễn mịn, lại được phun xịt tráng lên bản bằng áp lực lớn nên có độ chặt chẽ lớn. Trong khi đó chất hấp thu do nghiên cứu viên tự nạp cột trong phòng thí nghiệm là loại silica gel dùng cho sắc ký cột, với cỡ hạt lớn hơn, lại được nạp vào cột ở áp suất thường, nên có tính lỏng lẻo hơn.

So sánh độ chặt chẽ của cột sắc ký nạp chất hấp thu với cỡ hạt có kích cỡ khác nhau



Cột nạp với silica gel hạt to

Cột nạp với silica gel hạt mịn hơn

3.2. Tỉ lệ giữa lượng mẫu chất cần tách đối với kích thước cột

Sắc ký cột hở là sắc ký mà chất hấp thu được nhồi trong một cột bằng thủy tinh. Kích cỡ của cột tùy thuộc vào số lượng mẫu chất cần phân tách. Cột nhỏ nhất có thể tích chỉ vài ml với đường kính cột vài mm, chiều dài cột vài cm, trong khi một cột lớn nhất có đường kính cột vài cm và chiều dài cột dài tương ứng.

Muốn tách chất được tốt, các kết quả thực nghiệm cho thấy có mối liên quan giữa lượng mẫu chất cần tách đối với kích thước cột, với hai điều sau đây:

3.2.1. Tỉ lệ giữa lượng mẫu cần tách và lượng chất hấp thu sử dụng

Các khảo sát thực nghiệm cho thấy muốn tách chất tốt thì ***trọng lượng chất hấp thu phải lớn hơn 25 - 50 lần trọng lượng của mẫu*** cần sắc ký (tính theo trọng lượng). Tuy nhiên, với những hỗn hợp các hợp chất khó tách riêng

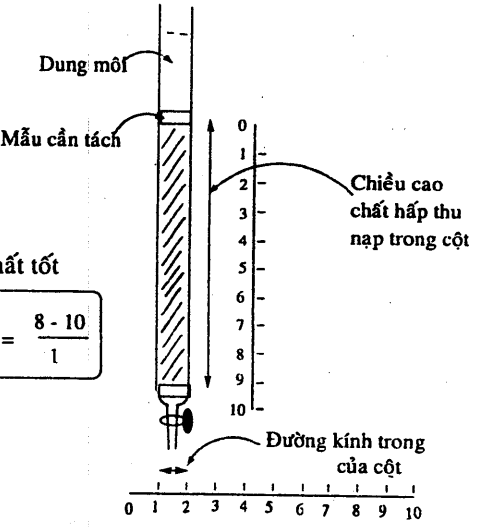
thì cần sử dụng số lượng chất hấp thu nhiều hơn (lớn hơn 100-200 lần), còn với các hỗn hợp dễ tách thì có thể sử dụng lượng chất hấp thu ít hơn.

Vì thế trước khi tiến hành sắc ký, phải dự đoán trước rằng với một lượng mẫu chất muốn tách (x gam) phải cần bao nhiêu lượng chất hấp thu, sao cho chất hấp thu chiếm một chiều cao phù hợp trong cột mà cột vẫn còn chỗ để chứa dung môi. Với lượng chất hấp thu cụ thể, phải đi tìm một cột sắc ký với kích thước phù hợp.

3.2.2. Tỉ lệ giữa chiều cao chất hấp thu trong cột và đường kính trong của cột sắc ký

Các khảo sát thực nghiệm cũng cho thấy muốn tách chất tốt, chiều cao của chất hấp thu nạp trong cột cần đạt tỉ lệ: ***chiều cao chất hấp thu : đường kính trong của cột*** vào khoảng (**10 : 1**) như mô tả trong hình 20.

Muốn biết lượng chất hấp thu có phù hợp với cột thì cho chất hấp thu khô vào cột để quan sát.



Kết quả thực nghiệm để tách chất tốt

$$\frac{\text{Chiều cao của chất hấp thu trong cột}}{\text{Đường kính trong của cột}} = \frac{8 - 10}{1}$$

Hình 20: So sánh chiều cao chất hấp thu trong cột với đường kính trong của cột

3.3. Nạp chất hấp thu vào cột

Muốn tách riêng các hợp chất trong hỗn hợp một cách có hiệu quả, chất hấp thu phải được nạp trong cột một cách đồng nhất để hạn chế những dãy xéo, bất thường.

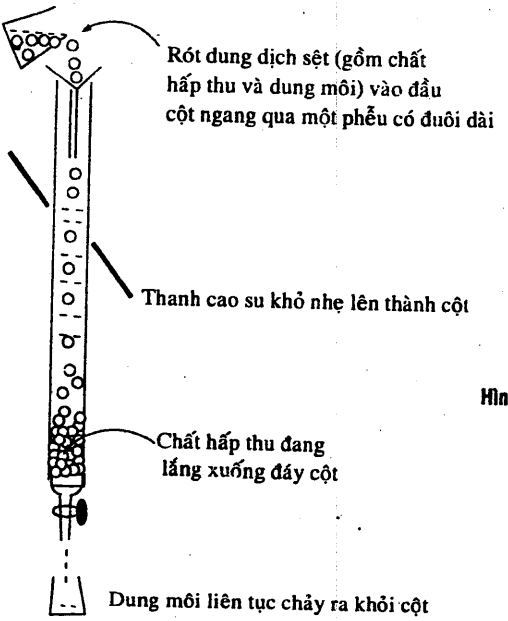
Kích cỡ hạt giữ vai trò quan trọng: trong sắc ký cột hở, dung môi chảy ra khỏi cột nhờ trọng lực, cho nên nếu sử dụng hạt hấp thu có cỡ hạt quá mịn, cột sẽ quá chặt chẽ, dung môi không thể chảy ra khỏi cột. Để có thể có một vận tốc chảy chấp nhận được, kích cỡ hạt chất hấp thu phải > 150 μm.

Có hai kiểu nạp chất hấp thu vào cột: nạp sệt và nạp khô.

3.3.1. Nạp chất hấp thu *dạng sệt* vào cột

Dùng kẹp để giữ cho cột thẳng đứng trên giá. Nếu phần đầu ra của cột không có miếng thủy tinh xốp để chặn thì có thể dùng một bông thủy tinh để chặn, tiếp theo phủ cát lên để có được một mặt bằng phẳng.

Chất hấp thu được nạp vào cột ở dạng sệt, được chuẩn bị như sau:



Hình 21: Thực hiện sự nạp cột sệt

✳ Trong một becher đã có chứa sẵn dung môi (dung môi là loại dung môi ít phân cực nhất được dùng để bắt đầu cho quá trình giải ly cột), cho chất hấp thu vào becher, đều đặn, mỗi lần một lượng nhỏ, vừa rót vừa khuấy nhẹ đều. *Lưu ý* không được thực hiện ngược lại nghĩa là rót dung môi vào chất hấp thu bởi vì chất hấp thu gặp dung môi sẽ phát nhiệt, có thể làm chất hấp thu vón cục, sẽ không đồng nhất.

Lượng dung môi sử dụng phải vừa đủ để hỗn hợp không được quá sệt khiến cho bọt khí sẽ bị bắt giữ trong cột và cũng không được quá lỏng.

✳ Nhờ một phễu lọc có đuôi dài, đặt trên đầu cột, rót hỗn hợp sệt vào cột, vừa mở nhẹ khóa ở bên dưới cột để cho dung môi chảy ra, hứng vào một becher trống để ở bên dưới cột, dung môi này được sử dụng lại để rót trả lại lên đầu cột.

✳ Tiếp tục rót chất sệt vào cột cho đến khi hết số lượng, vừa rót vừa dùng một thanh cao su khỏ nhẹ vào bên ngoài thành cột để chất hấp thu nén đều trong cột.

✳ Sau khi nạp xong, cho dung môi chảy ra và rót trở lại đầu cột vài ba lần để việc nạp cột được chặt chẽ, cho đến khi thấy chất hấp thu trong cột có dạng đồng nhất.

Lưu ý trong quá trình nạp cột, dung môi vẫn liên tục chảy nhẹ đều ra khỏi cột hứng, lượng dung môi này được sử dụng lại để rót trả lại lên đầu cột. ***Không được để cho đầu cột bị khô***, nghĩa là luôn luôn phải có dung môi phủ trên phần đầu cột.

✳ Sau khi nạp xong, mặt thoáng chất hấp thu ở đầu cột phải nằm ngang. Nếu mặt thoáng không nằm ngang, phải cho dung môi thêm cao lên trên phần đầu cột, dùng đũa thủy tinh khuấy đảo nhẹ phần dung môi gần sát mặt thoáng, làm xáo một phần chất hấp thu ở trên đầu cột, để yên, chất hấp thu lắng xuống từ từ tạo nên một mặt thoáng bằng phẳng.

[illegible] (chất hấp thu trong sắc ký lọc gel và trao đổi ion), cần có thời gian để gel trương nở. Thường người ta thêm đủ lượng dung môi để làm thành hỗn hợp sệt và để yên suốt một đêm, hôm sau thêm dung môi vào để hỗn hợp sệt có thể rót chảy, để rót vào cột.

3.3.2. Nạp chất hấp thu *dạng khô* vào cột

Dùng kẹp để giữ cho cột thẳng đứng trên giá, cho dung môi loại kém phân cực nhất có thể vào khoảng hai phần ba chiều cao cột. Ngang qua một phễu lọc có đuôi dài, cho chất hấp thu ở dạng bột khô vào thẳng trong cột, đều đặn, mỗi lần một lượng nhỏ, vừa cho vào vừa khỏ nhẹ thành cột. Khi lớp chất hấp thu đạt được chiều cao khoảng 2 cm trong cột, thì mở nhẹ khóa ở bên dưới cột để cho dung môi chảy ra, hứng vào một becher trống để ở bên dưới cột, dung môi này được sử dụng lại để rót trả lại lên đầu cột.

Sau khi nạp xong, cho dung môi chảy qua chất hấp thu vài lần đến khi thấy chất hấp thu trong cột có dạng đồng nhất.

Cả hai cách nhồi cột đều cho kết quả tốt nếu thực hiện việc nạp cột một cách cẩn thận. Trong trường hợp sau khi nạp xong, quan sát thấy có nhiều bọt khí, có những "bất thường" trong cột thì phải xả hết cột và nạp lại từ đầu.

3.4. Đặt mẫu chất cần tách lên đầu cột sắc ký

3.4.1. Nạp mẫu chất ở dạng dung dịch

Nếu mẫu ở dạng lỏng, có thể cho trực tiếp mẫu lên đầu cột sắc ký. Nếu mẫu ở dạng rắn, hòa tan mẫu chất vào một lượng nhỏ dung môi, loại dung môi khởi đầu cho sắc ký cột.

Dung dịch mẫu có nồng độ càng đậm đặc càng tốt, vì như thế *lớp dung dịch này nằm thành một lớp mỏng trên đầu cột*. Có thể áp dụng tính toán cụ thể như sau: thể tích dung môi $V = 0,4 \times D^2$ với D là đường kính trong của cột tính bằng mm; V tính bằng ml.

Thực hiện việc nạp mẫu lên đầu cột như sau.

* Mở khoá cho dung môi chảy ra khỏi cột, để hạ mức dung môi trong cột xuống sao cho vừa sát với mặt thoáng của chất hấp thu trong cột. *Mặt thoáng của chất hấp thu lúc này phải nằm ngang đều.*

* Đóng khoá lại, nạp dung dịch mẫu vào đầu cột. Muốn nạp mẫu, sử dụng một pipette để hút dung dịch mẫu chất, đặt đầu của pipette gần sát với mặt thoáng của chất hấp thu trong cột, vừa bóp vừa rây pipette dọc quanh

thành trong của cột, cho dung dịch chất chảy ra dọc theo thành trong của cột, chạm xuống bề mặt của chất hấp thu.

* Mở khóa bên dưới cho dung môi chảy ra khỏi cột, làm cho dung dịch mẫu được thấm hết vào chất hấp thu trên đầu cột, cần canh chừng không cho chất hấp thu ở đầu cột bị khô.

* Dùng pipette cho một lượng nhỏ *dung môi mới* lên đầu cột, tranh thủ dùng dung môi này để rửa sạch thành ống mà nãy giờ dung dịch mẫu chất đã trây dính trên thành cột. Lại mở khóa, cho dung môi chảy ra. Lặp lại vài lần việc rửa thành cột như thế để giúp cho dung dịch mẫu chất thấm sâu vào phần chất hấp thu ở phần đầu cột. Lặp lại như thế cho đến khi cho một ít dung môi lên đầu cột, dung môi sẽ trong suốt không màu (không bị lây màu của chất mẫu).

* Cho một lớp cát dầy khoảng 3-6 mm đặt nhẹ lên trên mặt thoáng của chất hấp thu để bảo vệ mặt cột. Nếu không có cát, có thể sử dụng bông thủy tinh, bông gòn, giấy lọc có đường kính vừa bằng với đường kính trong của cột. Cẩn thận để không làm xáo trộn bề mặt đang nằm ngay ngắn.

* Cuối cùng, cho dung môi vào đầy cột để bắt đầu quá trình giải ly.

3.4.2. Nạp mẫu chất ở dạng bột khô

Nếu mẫu chất không tan trong dung môi loại dung môi lựa chọn để bắt đầu quá trình sắc ký cột, vì đây là loại dung môi kém phân cực, thay vì phải hoà tan mẫu trong dung môi phân cực có thể ảnh hưởng vào quá trình giải ly, có thể nạp mẫu "khô".

Trong một bình cầu dùng để cô quay, mẫu cần sắc ký (X g) được hòa tan trong dung môi như etyl acetat hoặc metanol (50X g), cho thêm vào silica gel cỡ hạt lớn (10 X g). Hỗn hợp này được cô quay chân không đến khi có *bột silica gel khô*, bấy giờ, mẫu cần sắc ký đã được tẩm lên bề mặt của những hạt silica gel.

Đặt mẫu bột khô này lên trên đầu cột, dùng một ít dung môi (loại lựa chọn để bắt đầu quá trình sắc ký cột), thấm ướt phần *bột silica gel* . Cho một lớp cát dầy khoảng 3-6 mm đặt nhẹ lên trên mặt thoáng của chất hấp thu để

bảo vệ mặt cột. Cuối cùng cho dung môi vào đầy cột để bắt đầu quá trình giải ly.

3.5. Các kỹ thuật giải ly chất ra khỏi cột

Có thể tiến hành giải ly cột nhờ vào trọng lực, hoặc nhờ vào việc cho một dòng khí nén nitrogen lên trên đầu cột, hoặc nhờ vào lực hút đặt tại đầu ra của cột, hoặc dùng máy bơm để bơm dung môi giải ly đi vào đầu cột với những lực mạnh có thể điều chỉnh.

3.5.1. Nhờ vào trọng lực (trong kỹ thuật sắc ký cổ điển)

Muốn giải ly cột nhờ vào trọng lực, các hạt gel nạp cột phải có kích thước > 60 µm. Nếu sử dụng những hạt gel có kích thước nhỏ hơn, dung môi ra khỏi cột rất chậm, và cần phải nhờ đến một lực để có thể ra khỏi cột.

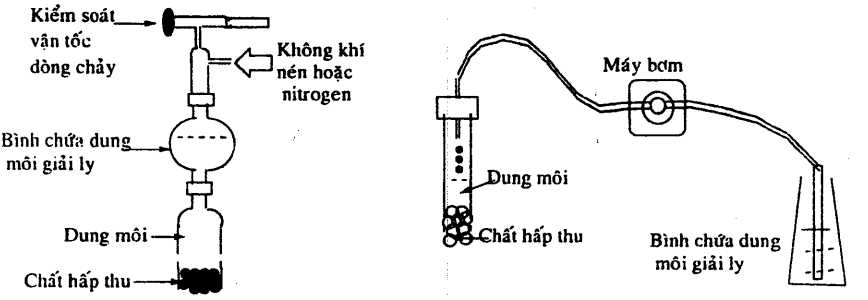
3.5.2. Sử dụng lực đẩy (trong sắc ký chớp nhoáng - flash chromatography)

Nhờ sử dụng một áp lực để đẩy dung môi đi ngang qua pha tĩnh nên trong sắc ký chớp nhoáng, có thể sử dụng những hạt gel có kích thước 40 - 63 µm, nhỏ hơn loại sử dụng trong sắc ký cột cổ điển. Loại cột dùng cho sắc ký chớp nhoáng phải có thành dầy, với lớp bao lưới che chắn bên ngoài để tránh khi sử dụng áp suất cao, cột có thể bị nổ vỡ. Quan sát cột trước khi sử dụng xem có những vết rạn nứt trên thành cột.

• Có thể sử dụng thiết bị như mô tả trong hình 22: Bình chứa dung môi được đặt trên đầu cột. Một dòng khí nén (khí nitrogen hoặc không khí) được cho vào đầu cột, sẽ đẩy dung môi đi xuyên ngang qua cột nén chặt.

• Cũng có thể sử dụng một máy bơm để hút dung môi từ bình chứa rồi đẩy vào đầu cột.

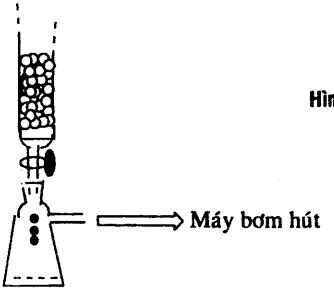
Trong cả hai trường hợp, có thể điều chỉnh tốc độ dòng chảy của dung môi nhờ vào một van điều chỉnh hoặc điều chỉnh nút của máy bơm. Chỉnh dòng chảy tốt nhất ở vận tốc 5cm/phút.



Hình 22: Hai loại dụng cụ giúp đẩy dung môi vào đầu cột cho sắc ký chớp nhoáng (flash-chromatography)

3.5.3. Sử dụng lực hút (trong sắc ký nhanh- cột khô)

Có thể sử dụng một máy bơm hút tạo chân không ở đầu ra của cột. Kỹ thuật này cũng cho kết quả tương tự như trên, nhưng việc thu lấy dung môi giải ly có phần kém thuận tiện vì phải ngưng tạo chân không, tháo thiết bị để rót dung môi ra. Tuy vậy, kỹ thuật này an toàn hơn.



Hình 23: Muốn cho dung môi giải ly đi ngang qua cột, có thể cho một lực hút ở đầu ra của cột sắc ký

Như vậy, các kỹ thuật sắc ký khác nhau là việc sử dụng kích thước khác nhau của hạt gel làm pha tĩnh và việc sử dụng áp lực để giải ly dung môi ra khỏi cột

- Cột-áp suất thấp, sử dụng cột làm bằng thủy tinh: thường sử dụng hạt có kích cỡ 40 -200 μm, sử dụng áp suất bình thường của bầu khí quyển.

- Cột-áp suất trung bình, sử dụng cột làm bằng thủy tinh dầy: thường sử dụng hạt có kích cỡ 25-40 μm; thực hiện ở áp suất 75- 600 psi (tức 5-40 bar).

- HPLC sử dụng cột làm bằng thép không rỉ: hạt nạp cột có kích cỡ 3-10 μm; thực hiện ở áp suất 500 -3.000 psi.

3.6. Dung môi giải ly và kỹ thuật tăng dần tính phân cực cho dung môi giải ly

Những dung môi loại tiêu chuẩn thương phẩm thường có lẫn một ít tạp chất, nhất là các dung môi loại hydrocarbon thường chứa nhiều tạp hơn những dung môi khác. Chỉ cần dung môi có lẫn một ít tạp chất, thí dụ với benzen có lẫn một ít metanol, độ phân cực của dung môi đã thay đổi đáng kể. Vì thế cần chưng cất dung môi trước khi sử dụng.

Cần nên tránh sử dụng một vài dung môi cho silica gel nhất là cho alumin dạng acid hoặc base hoặc dạng hoạt tính mạnh. Thí dụ: dung môi aceton có thể bị dimer hóa bằng phản ứng aldol hóa để tạo thành diaceton alcol. Dung môi etyl acetat hoặc alcol có thể cho phản ứng trans-ester hóa. Cuối cùng là những dung môi hoạt tính cao như: pirydin, methanol, nước, acid acetic có thể hòa tan và giải ly luôn cả chất hấp thu silica gel.

Trong sắc ký cột, có khi chỉ cần sử dụng một đơn dung môi là có thể giải ly tất cả các chất ra khỏi cột, đôi khi cần đến hỗn hợp dung môi. Nhưng thường nhất là trước tiên, dùng dung môi không phân cực để giải ly những hợp chất tương đối không phân cực; tiếp đó, dùng dung môi có tính phân cực mạnh hơn để giải ly những hợp chất phân cực.

Dung môi với lực giải ly tăng dần được sắp xếp một cách tương đối như trong bảng 8. Bảng còn cho biết thêm một số thông tin về dung môi như nhiệt độ sôi, độ nhớt, độ hòa tan trong nước, thuận tiện cho việc thực hành trong phòng thí nghiệm.

Việc sắp xếp các dung môi theo các tác giả có khác nhau chút ít, là do mỗi tác giả căn cứ trên những chỉ số khác nhau. Có thể tham khảo thêm trong chương sắc ký lớp mỏng.

Có hai kiểu giải ly: giải ly sử dụng dung môi đơn nồng độ và giải ly với dung môi có tính phân cực tăng dần. Dung môi có tính phân cực tăng dần theo kiểu bậc thang hoặc theo kiểu tăng dần tuyến tính.

3.6.1. Giải ly sử dụng dung môi đơn nồng độ (isocratic)

Chỉ sử dụng đơn dung môi hoặc hỗn hợp dung môi nhưng trong hỗn hợp tỉ lệ giữa các thành phần không thay đổi, để giải ly cho đến khi việc tách chất hoàn tất.

3.6.2. Giải ly có nồng độ tăng theo kiểu bậc thang (stepwise)

Đôi khi, việc sử dụng một loại dung môi sẽ chỉ giải ly ra khỏi cột một số cấu tử nhất định nào đó và một số cấu tử khác có tính phân cực hơn vẫn còn nằm ở đầu cột. Nếu muốn đuổi chúng ra khỏi cột, phải dùng một dung môi có lực mạnh hơn. Trong quá trình sắc ký, cần thay nhiều loại dung môi khác nhau, có lực mạnh tăng dần (độ phân cực tăng dần) để có thể đuổi hết các cấu tử khác nhau ra khỏi cột.

Muốn tăng tính phân cực cho bất kỳ một dung môi nào, *nhất thiết phải tăng chậm*: thêm từ từ mỗi lần vài phần trăm một dung môi mới có tính phân cực hơn vào dung môi cũ đang sử dụng. Thí dụ: đang giải ly với hexan, muốn chuyển sang benzen, sẽ pha benzen vào hexan theo tỉ lệ 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 50% và 100% benzen...

Các kết quả nghiên cứu thực nghiệm đã giải thích vì sao lại cho thêm dung môi phân cực vào dung môi kém phân cực theo nồng độ không tăng dần đều mà lại tăng nhảy vọt như các con số nêu trên, bởi vì người ta nhận thấy các dung dịch với nồng độ 1%, 2%, 3%, 5%, 10% có tính phân cực tăng theo lượng dung môi phân cực cho thêm vào; trong khi đó các dung dịch 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% lại có tính phân cực tăng lên rất ít, *gần như tương đương nhau*. Do đó, việc giải ly với các dung dịch có nồng độ như thế, làm mất thời gian.

Nếu tăng tính phân cực nhanh, đột ngột sẽ làm gãy cột. Điều này được giải thích do alumin hoặc silica gel khi được trộn với bất kỳ một loại dung môi nào cũng tạo ra nhiệt, nhiệt này làm cho dung môi bốc hơi một cách cục bộ, hơi sinh ra tạo nên bọt khí làm nứt gãy cột. Cột gãy làm mất đi sự liên tục của chất hấp thu và vì thế không tách chất tốt được.

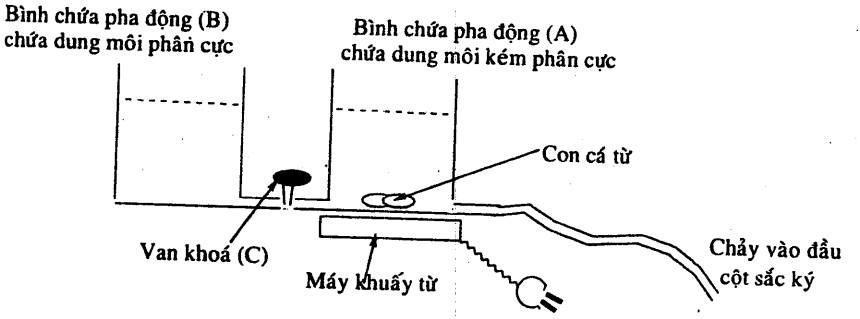
Bảng 8: Các dung môi thường dùng trong sắc ký cột, được sắp xếp theo chỉ số phân cực tăng dần[3].

Dung môi	Nhiệt độ sôi (°C)	Hằng số điện môi ε (ở 25°C)	Chỉ số phân cực	Độ nhớt ($mN.S.m^{-2}$)	Độ tan trong nước (% w/w)
Pentan	36	1,80	0,0	0,23	0,004
Hexan	69	1,90	0,0	0,33	0,001
Heptan	98	-	0,0	0,39	0,0003
Cyclohexan	81	2,0	0,2	1,00	0,01
Tetraclorur carbon	77	2,2	1,6	0,97	0,08
Toluen	111	2,38	2,4	0,59	0,51
Xylen	139	-	2,5	0,61	0.018
Benzen	80	2,3	2,7	0,65	0,18
Dietyl eter	35	4,34	2,8	0,32	6,89
Diclorometan	41	8,9	3,1	0,44	1,6
Dicloroetan	84	-	3,5	0,79	0,81
Isopropanol	82	18,3	3,9	2,3	100
n-Butanol	118	-	3,9	2,98	7,81
Tetrahydrofuran	65	7,58	4,0	0,55	100
n-Propanol	92	20,1	4,0	2,27	100
Butyl acetat	125	-	4,0	0,73	0,43
Cloroform	61	4,87	4,1	0,57	0,815
Etyl acetat	77	6,0	4,4	0,45	8,7
Metyl etyl ceton	80	-	4,7	0,45	24
Dioxan	101	2,2	4,8	1,54	100
Aceton	56	20,7	5,1	0,32	100
Metanol	65	33,6	5,1	0,6	100
Etanol	78	24,3	5,2	1,2	100
Acetonitril	82	37,5	5,8	0,37	100
Acid acetic	118	6,2	6,2	1,26	100
Dimetylformamid	155	36,7	6,4	0,92	100
Dimetyl sulfoxid	189	4,7	7,2	2,0	100
Nước	100	78,5	9,0	1,0	100

3.6.3. Giải ly với nồng độ tăng dần tuyến tính (gradient)

Để tạo dung môi giải ly có độ phân cực tăng dần đều, có thể sử dụng những thiết bị bán sẵn, hoặc có thể tự chế, như hình 24.

Sử dụng hai bình A và B thông nhau ở đáy bởi một ống ngắn có van khoá C ở giữa ống để ngăn hai bình. Bình A có đầu ra để dẫn dung môi vào đầu cột sắc ký. Bình A được đặt trên một máy khuấy từ, trong bình A có một con cá từ. Bình B chứa dung môi có tính phân cực mạnh hơn, thí dụ benzen; bình A chứa dung môi có tính phân cực yếu hơn, thí dụ hexan. Cho máy khuấy từ chạy, mở van khoá C để thông hai bình với nhau, một lượng x ml dung môi trong bình B sẽ tràn qua bình A. Tại đây máy khuấy sẽ trộn thành hỗn hợp dung môi và một lượng x ml hỗn hợp dung môi ở A sẽ chảy ra, đi vào đầu cột sắc ký (nhờ đặc tính của bình thông nhau). Cứ tiếp tục như thế thì càng lúc dung môi trong bình A càng có tính phân cực tăng dần đều.



Hình 24: Mô tả thiết bị bình thông nhau để tạo dung môi tăng dần tính phân cực một cách tuyến tính

3.7. Vận tốc giải ly cột

Vận tốc chảy của dung môi giải ly không được quá nhanh (sẽ không kịp cân bằng với chất hấp thu) cũng không được quá chậm hoặc bị cho ngừng lại một thời gian vì lúc đó các dãy chất tan sẽ khuếch tán hoặc trải dài theo mọi hướng (all directions) làm xấu quá trình tách.

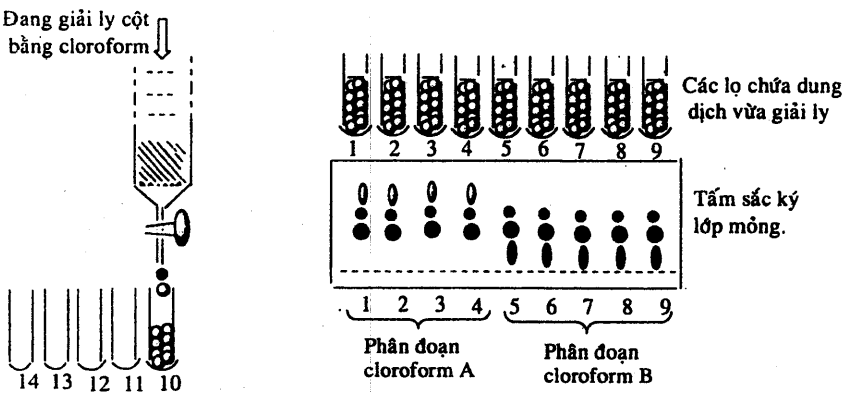
Thường thường trong đa số sắc ký cột, vận tốc giải ly là khoảng ***5 - 50 giọt /phút*** hoặc ***1-2 cm/phút***.

3.8. Theo dõi quá trình giải ly cột

Với các mẫu nguyên liệu ban đầu có màu, quá trình giải ly bằng sắc ký cột có thể được theo dõi bằng mắt thường, nhờ nhìn thấy các dãy lớp có màu sắc khác nhau, đang tách xa nhau ra. Theo dõi các dãy màu và hứng chúng khi được giải ly ra khỏi cột. Nhưng đa số các hợp chất hữu cơ thường không màu, nên dung dịch giải ly cũng trong suốt không màu, phải theo dõi bằng những cách khác nhau.

Phương pháp thông dụng nhất là hứng dung dịch giải ly trong những lọ (erlen) có đánh số thứ tự, như minh hoạ trong hình 25. Hứng mỗi lọ một thể tích như nhau, thường là 50 ml. (Cần lưu ý là phải pha sẵn một lượng khá lớn dung môi, từ nửa lít đến vài lít, để giải ly, chớ không nên pha từng lọ 50 ml vì sẽ có sai lệch về nồng độ trong mỗi lọ).

Dung dịch trong những lọ hứng được sẽ được sắc ký lớp mỏng trên cùng một bản mỏng. Những lọ nào có kết quả sắc ký lớp mỏng giống nhau (giống nhau, nhưng có thể chứa nhiều loại hợp chất, vì là hỗn hợp) sẽ được gom chung lại với nhau thành một phân đoạn. Đuổi dung môi ở áp suất kém các phân đoạn này sẽ cho cao của phân đoạn đó.



Hình 25: Cách theo dõi quá trình sắc ký cột bằng sắc ký lớp mỏng.
Các lọ có sắc ký lớp mỏng giống nhau được gom lại chung với nhau thành một phân đoạn

3.8.1. Khi nào thay đổi dung môi giải ly cột

Sắc ký cột được khởi đầu bằng loại dung môi nào là do kết quả sắc ký lớp mỏng trên cao ban đầu. Thí dụ khởi đầu sắc ký cột bằng eter dầu hỏa, cứ tiếp tục giải ly cho đến khi lọ cuối cùng, hứng dung dịch giải ly ra, đuổi hết dung môi ra khỏi lọ này, cân lại không thấy có cặn hoặc còn cặn không đáng kể, hoặc đuổi bớt dung môi rồi chấm sắc ký lớp mỏng mà không còn hiện vết nữa. Điều này có nghĩa là dung môi eter dầu hoả đã lôi hết ra khỏi cột những hợp chất không phân cực trong cao đã nạp ở đầu cột.

Chú ý: Bắt buộc đuổi bớt dung môi trước khi chấm sắc ký lớp mỏng, vì nếu để nguyên dung dịch trong lọ, dung dịch quá loãng, nên dù có *chấm rất nhiều lần lên cùng 1 chấm,* bản mỏng cũng không hiện vết, nên nghĩ lầm rằng đã kéo hết chất ra khỏi cột, dẫn đến quyết định sai.

Tiếp theo, cần tăng thêm độ phân cực cho dung môi giải ly để tiếp tục quá trình sắc ký cột. Lần lượt giải ly từ dung môi không phân cực đến dung môi phân cực.

3.9. Tổng kết quá trình sắc ký cột

Vừa giải ly cột, vừa phải theo dõi dung dịch giải ly bằng sắc ký lớp mỏng để gom thành những phân đoạn. Chỉ ngưng cột khi đã thu được tổng lượng cao các phân đoạn bằng 70 -80% trọng lượng mẫu đã nạp vào đầu cột.

Kết quả sắc ký cột phải được trình bày thành bảng tổng kết, tóm tắt nhưng đầy đủ chi tiết, thí dụ như bảng 9.

Một số điểm nhận xét từ sự phân tích bảng 9.

Bảng 9: Kết quả sắc ký cột silica gel trên cao cloroform (17g) của rễ cây Bạch hoa xà.

Số thứ tự lọ	Tên phân đoạn	Dung môi giải ly cột	Cao (g)	Sắc ký lớp mỏng	Thuốc thử alcaloid	Hoạt tính sinh học	Ghi chú
1-22	BH1	E	1,45	3 vết (a)	âm tính	âm tính	
23 - 45	BH2	E	0,06	2 vết (a)	âm tính	dương tính	
46 - 65	BH3	E:B (99:1)	1,23	2 vết (a)	âm tính	âm tính	
66 - 89	BH4	E:B (98:2) E:B (95:5)	0,78	4 vết (b)	dương tính	dương tính	

90 -167	BH5	E:B (90:10) E:B (50:50)	0,90	2 vết (b)	dương tính	dương tính	Tiếp tục khảo sát
168-205	BH6	B	0,65	3 vết (b)	dương tính	dương tính	Tiếp tục khảo sát
206-390	BH7	B:C (99:1) B:C (90:10) B:C (50:50) C	1,43	6 vết (c)	âm tính	dương tính	
391-600	BH8	C:EA (99:1) C:EA (75:25)	1,80	2 vết (c)	dương tính	dương tính	Tiếp tục khảo sát
601-850	BH9	C:EA (50:50)	2,10	5 vết (c)	âm tính	dương tính	
851-980	BH10	M	1,8	4 vết (c)	âm tính	dương tính	

Tổng lượng cao thu được: 12,2 g (hiệu suất 71,7%)

Ghi chú: E: eter dầu hỏa; B: benzen; C: cloroform; AE: etyl acetat: M: metanol

(a): hệ dung môi sắc ký lớp mỏng là benzen: cloroform (7: 3)

(b): hệ dung môi sắc ký lớp mỏng là benzen: etyl acetat (8:2)

(c): hệ dung môi sắc ký lớp mỏng là cloroform: metanol (9:1)

3.9.1. Thứ tự các lọ hứng dung dịch giải ly

Các lọ được đánh số liên tục cho dù có đổi hệ dung môi giải ly cột. Điều này giúp cho những người đi sau muốn thực hiện trở lại sắc ký sẽ biết cần sử dụng loại dung môi với lượng thể tích cần thiết.

3.9.2. Tên phân đoạn

Trong một bài thực nghiệm, đôi khi sẽ phải thực hiện nhiều sắc ký cột, nên cần phải đánh số tên phân đoạn để trong quá trình viết bài sẽ thuận tiện khi muốn nhắc đến phần nào của bài. Nên đánh số bằng số 1, 2, 3, 4, 5... không nên sử dụng số la mã I, II, III, IV, V, VI... vì chữ số la mã rất dễ lẫn loan, thí dụ như IV và VI. Có thể thêm những chữ để tiện việc theo dõi như trong bài là chữ BH (ý muốn nói cây Bạch hoa xà).

3.9.3. Dung môi giải ly cột

Lần lượt giải ly cột từ dung môi không phân cực đến dung môi phân cực. Nếu muốn tăng tính phân cực cho một dung môi đang giải ly: thêm từ từ mỗi lần vài phần trăm một dung môi mới có tính phân cực hơn vào dung môi

cũ đang sử dụng. Đôi khi, do đã có nhiều kinh nghiệm, thì tùy trường hợp có thể tăng nhanh.

Trong bảng 9, một phân đoạn trình bày trong bảng tổng kết là do khi sắc ký lớp mỏng của các lọ có kết quả giống nhau, *bất kể rằng lọ đó được giải ly ra khỏi cột bằng hệ dung môi nào.* Thí dụ phân đoạn BH7, gồm nhiều hệ dung môi giải ly cột khác nhau nhưng vẫn được gom lại chung thành 1 phân đoạn.

3.9.4. Lượng cao

Các lọ được gom lại với nhau và thu hồi dung môi bằng máy cô quay chân không để tránh sự hư hại của hợp chất bởi nhiệt. Cần chú ý tráng các lọ với dung môi để không bị mất chất. Lượng cao có thể được trình bày bằng gam hoặc bằng miligam.

Chỉ ngưng cột khi đã thu được tổng lượng cao các phân đoạn bằng 70-80% trọng lượng mẫu đã nạp vào đầu cột. Trong bảng 9, lượng cao thu được chiếm khoảng 72%. Người ta thường dùng dung môi metanol để giải ly cột cuối cùng để có thể tổng kết phần sắc ký cột, trong khi trên thực tế, cao phân đoạn này thường chứa nhiều nhầy nhựa gồm nhiều chất có tính phân cực mạnh; sắc ký lớp mỏng có nhiều vết; rất khó có thể cô lập được chất tinh khiết.

3.9.5. Sắc ký lớp mỏng

Hệ dung môi cho sắc ký lớp mỏng, áp dụng cho một phân đoạn, sẽ khác với hệ dung môi dùng để giải ly phân đoạn đó ra khỏi cột. Lý do là chất hấp thu silica gel dùng để nạp cột có cỡ hạt và độ chặt chẽ khác với chất hấp thu silica gel dùng để tráng bản mỏng.

- *Để dò được hệ dung ly phù hợp*: Trong bảng 9, sử dụng ba loại hệ dung ly cho sắc ký lớp mỏng. Việc chọn hệ dung môi để sắc ký lớp mỏng dựa vào tài liệu (đã có tác giả công bố việc làm trên cùng cây, hoặc dựa vào tính chất chung về một loại hợp chất nào đó) hoặc *tự mày mò tìm lấy*. Hệ dung môi phù hợp là hệ cho các vết chính hiện diện trong khoảng 1/3 đến 2/3 chiều dài triển khai bản mỏng (Xem thêm bài sắc ký lớp mỏng).

- *Để nhận định một phân đoạn chỉ chứa một hay là nhiều chất*: Việc quan sát các vết hiện ra trên bản mỏng rất quan trọng để có thể nhận định rằng *phân đoạn thu được là hỗn hợp **nhiều chất*** (có nhiều vết; các vết có độ đậm như nhau) hoặc *phân đoạn thu được là **một chất** tương đối sạch tuy vẫn có chứa một ít tạp chất* (có một vết chính chiếm 80%, ngoài ra còn có một số vết mờ).

Cần nhắc lại là nếu chọn hệ dung ly đẩy các vết xa hơn 2/3 chiều dài triển khai bản mỏng (Rf ≥ 0,7), các vết sẽ dễ dàng trùng với nhau, dẫn đến hậu quả là ***chỉ cho thấy có một vết trên bản mỏng***, làm cho quan sát viên tưởng nhầm là phân đoạn chỉ có chứa một hợp chất, trong khi trên thực tế là có nhiều chất.

- *Để kiểm tra xem một hợp chất có tinh khiết:* sử dụng sắc ký lớp mỏng lần lượt với ba hệ dung ly hoàn toàn khác hẳn nhau (không được một hệ dung ly nhưng với ba tỉ lệ khác nhau, thí dụ benzen: cloroform (9:1); benzen: cloroform (7: 3) và benzen: cloroform (2:8).

Dò tìm chọn một hệ sẽ đẩy các vết đi xa so với điểm xuất phát, một hệ đẩy các vết hiện diện ở khoảng giữa bản và một hệ đẩy các vết đi 1/3 bản Nếu dù sử dụng hệ dung ly nào, chất cũng chỉ cho hiện ra một vết duy nhất thì có thể kết luận là chất tinh khiết. Nếu chất không tinh khiết, qua những lần thay đổi hệ dung ly như thế, sẽ cho thấy bên cạnh vết chính có thêm vết khác. Như vậy chất đó cần phải tinh chế thêm.

Muốn khảo sát thấy rõ hơn thì dùng HPLC.

3.9.6. Chọn phân đoạn nào để tiếp tục khảo sát

Dù sử dụng kỹ thuật sắc ký loại gì (sắc ký cột cổ điển, sắc ký chớp nhoáng, sắc ký nhanh-cột khô...) sắc ký cột lần đầu ***khó cho ngay*** một phân đoạn chỉ chứa một chất tinh khiết. Thường các phân đoạn chứa hai hoặc nhiều chất khác nhau. Phải tiếp tục sắc ký nhiều lần mới có thể thu được *một hợp chất tinh khiết.* Phải là đơn chất tinh khiết mới có thể xác định cấu trúc hóa học bằng các phương pháp hóa lý hiện đại IR, UV, khối phổ, ^{1}H-RMN, ^{13}C-RMN.... Không thể khảo sát hết được các phân đoạn thu được từ bảng 9, mà chỉ chọn một vài phân đoạn để tiếp tục khảo sát.

Hoặc chọn phân đoạn nào thoả yêu cầu đặt ra lúc ban đầu, thí dụ chỉ muốn khảo sát các hợp chất alcaloid, hoặc acid triterpen, hoặc flavon... Các phân đoạn của bảng 9 được sắc ký lớp mỏng và bản mỏng này được hiện hình với thuốc thử đặc trưng của những nhóm hợp chất vừa nêu, phân đoạn nào dương tính với thuốc thử sẽ được chọn.

Hoặc chọn phân đoạn nào thoả yêu cầu đặt ra lúc ban đầu là muốn cô lập hợp chất có hoạt tính sinh học. Các phân đoạn của bảng 9 được gởi đi thử nghiệm hoạt tính sinh học (khả năng giết vi khuẩn, khả năng giết chết các tế bào ung thư...). Phân đoạn nào có kết quả thử nghiệm dương tính sẽ được chọn.

Tuy nhiên, nên chọn phân đoạn có lượng cao nhiều để sắc ký cột lần thứ nhì hoặc lần thứ ba hoặc áp dụng phương pháp kết tinh phân đoạn, phương pháp *kết tinh lại* (recrystallization) có sử dụng bột than hoạt tính. Nếu phân đoạn có lượng cao ít, các vết cách xa nhau, có thể sắc ký điều chế. Các chất thu được, trước khi gởi đi khảo sát cấu trúc hóa học, cần phải được kết tinh lại.

Các phân đoạn có lượng cao quá ít, có sắc ký lớp mỏng cho nhiều vết, đành phải bỏ qua, rất khó tiếp tục khảo sát, vì nếu có cô lập được chất tinh khiết sẽ không đủ lượng mẫu để khảo sát cấu trúc hoá học bằng các phương pháp hóa lý hiện đại (cần ít nhất khoảng 30 mg).

3.10. Các phương pháp xác định cấu trúc hóa học của một hợp chất

Chỉ nên tìm cách xác định cấu trúc hóa học của một hợp chất tinh khiết sau khi đã kết tinh lại nhiều lần trong dung môi phù hợp (độ tinh khiết 95% là đạt yêu cầu). Một hỗn hợp gồm hai chất hoặc chỉ có một chất nhưng còn lẫn nhiều tạp bẩn thì không nên phí tiền bạc để xác định cấu trúc hóa học, vì sẽ không giải đoán được cấu trúc hóa học.

Muốn kiểm tra một hợp chất đã tinh khiết chưa, sử dụng sắc ký lớp mỏng với ba loại hệ dung ly khác hẳn nhau đều cho một vết duy nhất, dĩ nhiên Rf khác nhau, có thể kết luận là chất tinh khiết.

Lượng mẫu tối thiểu để đo hết các chỉ tiêu là 30-50 mg, đây là trường hợp đặc biệt đối với các nghiên cứu viên công tác tại TP. HCM, vì mẫu gởi đi đo sẽ mất hết không được hoàn trả lại. Trong khi ở nơi khác, chỉ cần một lượng nhỏ mẫu, đo một chỉ tiêu trong một loại dung môi nào đó, thu hồi dung môi để có trở lại trạng thái khô sạch-ban đầu, rồi lại gởi đo một loại chỉ tiêu khác.

Cố gắng lưu lại mẫu. Trình bày kết quả khảo sát cấu trúc hóa học của một hợp chất theo các chi tiết sau.

Đầu tiên, cần nhắc lại là hợp chất đang khảo sát đã được thu từ phân đoạn nào của sắc ký cột, trên loại cao nào...

1. ***Mô tả dạng và màu sắc của sản phẩm*** (dạng bột, dạng hình vảy, hình kim; không màu hoặc có màu vàng, màu đỏ...; có mùi thơm như hoa gì, trái gì...).

2. ***Sắc ký lớp mỏng*** trong hệ dung ly gì; với thuốc hiện hình gì; cho một vết với Rf =...

Hình chụp bản mỏng được trình bày ở hình số mấy trong bài.

3. ***Điểm nóng chảy*** là bao nhiêu ....°C (dung môi kết tinh lại).

4. ***Năng lực triển quang***: $[\alpha]_D$ = ... (c = ...; dung môi đo....).

5. ***Khối phổ*** (phụ lục số x1), Sử dụng kỹ thuật đo nào? Thí dụ MS (kỹ thuật EI), *m/z* là mũi ion mẹ là $[M]^+$. Hoặc LC-MS (kỹ thuật APCI) cho mũi ion mẹ là $[M+1]^+$.

Kỹ thuật MS có thể đo tất cả các hợp chất hữu cơ, nhưng phải gửi mẫu ra Viện Hóa học ở Hà Nội.

Kỹ thuật LC-MS có thể gửi mẫu đo tại Trung tâm dịch vụ và phân tích thử nghiệm tại TP. HCM hoặc ở Viện Hóa học TP. HCM, nhưng kỹ thuật này chỉ áp dụng được đối với các hợp chất có thể hòa tan trong dung môi metanol hoặc acetonitril, nghĩa là các hợp chất có tính phân cực. Không thể đo khối phổ LC-MS với các hợp chất sterol.

6. ***Phân tích nguyên tố*** (phụ lục số x2): tại Trung tâm dịch vụ và phân tích thử nghiệm tại TP. HCM. Khi gửi mẫu phải yêu cầu rõ cần phân tích nguyên tố nào (C; H; N; S; Cl...). H% = ...; C% = ...; N% = ...

7. ***Phổ hồng ngoại IR,*** KBr (phụ lục số x3), ν_{max} cm^{-1} : 3320 (O-H); 2989 (C-H); 1725 (C=O); 1660 (C=C)...

8. ***Phổ tử ngoại:*** λ_{max} . Chỉ đo khi hợp chất có chứa nối đôi liên hợp.

9. ***^{1}H-RMN,*** $CDCl_3$, 500 MHz, (phụ lục số x4), δ ppm

10. ***^{13}C-RMN,*** $CDCl_3$, 125 MHz kết hợp với DEPT-RMN (phụ lục số x5...), δ ppm

Cần so sánh với hợp chất đã có công bố trong tài liệu. Vì thế cần phải lập bảng so sánh để chứng minh.

Sau khi biện luận các tín hiệu của các loại phổ, so sánh với các số liệu trong tài liệu (đôi khi cần phải so sánh với nhiều tài liệu), sẽ đề xuất cấu trúc hóa học của hợp chất cô lập được. Cấu trúc này phải đáp ứng tất cả các chỉ tiêu hóa lý đã nêu trên. Đôi khi cần phải điều chế một số dẫn xuất của hợp chất cô lập được.

4. MỘT VÀI KỸ THUẬT SẮC KÝ CỘT KHÁC

Việc tách một hỗn hợp ra thành những đơn chất là một giai đoạn nhất thiết phải trải qua đối với các nghiên cứu viên, nên bên cạnh kỹ thuật sắc ký cột cổ điển, với những ưu và nhược điểm đã trình bày ở phần trên, nhiều tác giả đã đề xuất nhiều kỹ thuật sắc ký cột khác để tạo sự thuận lợi cho các nghiên cứu viên đang làm việc trong những phòng thí nghiệm chưa trang bị đầy đủ các thiết bị hiện đại, đó là:

- Sắc ký cột khô (Dry-column chromatography).

- Sắc ký nhanh (có tác giả gọi là sắc ký chớp nhoáng) (Flash chromatography).

- Sắc ký nhanh cột khô (Dry-column flash chromatography).

4.1. Sắc ký cột khô (Dry-column chromatography) [2]

Kỹ thuật này tương đồng với kỹ thuật sắc ký lớp mỏng điều chế.

- *Chất hấp thu*: Sử dụng alumina hoặc silica gel loại dùng cho sắc ký lớp mỏng, có thể trộn thêm chất chỉ thị phát huỳnh quang. Liều lượng sử dụng: 1 g mẫu chất, cần 300 g chất hấp thu khô.

- *Mô tả hệ thống*: Sử dụng một ống celophan có đường kính 2-5cm được dựng thẳng đứng. Đáy ống được hàn lại, tạo dáng hình trụ và đầu đáy này có đặt một lớp bông thủy tinh. Đáy ống được soi thủng nhiều lỗ nhỏ bằng cây kim may.

- *Nạp chất hấp thu vào ống*: Chất hấp thu được nạp khô vào ống. Đầu tiên, cho chất vào 1/3 cột, dộng nhè nhẹ ống lên mặt ghế hay mặt bàn để nén chất cho chặt chẽ, tiếp tục nhồi để có một ống thẳng cứng có thể cầm trên tay (trong suốt quá trình nhồi, đầu trên được để hở).

- *Nạp mẫu vào đầu cột*: Có thể nạp mẫu dạng ướt: Mẫu được hòa tan trong một lượng tối thiểu dung môi, dùng ống nhỏ giọt đặt dung dịch mẫu phủ đều lên trên đầu cột và để yên một lúc cho dung môi bay đi.

Có thể nạp mẫu dạng khô: trong một becher, hòa tan mẫu trong một dung môi dễ bay hơi như dietyl eter hoặc diclorometan, cho vào một lượng chất hấp thu loại dùng cho sắc ký cột với trọng lượng gấp năm lần lượng mẫu, trộn đều rồi cô quay thu hồi dung môi, sẽ có được bột rắn khô. Phủ lớp bột này lên trên đầu cột đã nhồi lúc nãy.

Sau cùng, phủ một lớp cát lên trên đầu cột để bảo vệ mặt thoáng của cột (trước đó cát đã được rửa bằng acid, nước cất, sấy khô). Cũng có thể sử dụng lớp bông thủy tinh hoặc bông gòn.

- *Triển khai sắc ký*: Ống được dựng đứng và dung môi được cho chảy từ trên đầu ống xuống cuối ống nhờ vào trọng lực. Cho dung môi vào đầu cột, giữ sao cho có một lớp dung môi dầy 3-5 cm trên đầu cột.

Tốt nhất là thực hiện bằng cách chứa dung môi trong một bình lóng, đậy kín nắp lại. Nắp bình luôn đóng, nhưng mở khóa bình cho dung môi chảy ra khỏi bình cho đến khi áp lực trong bình lóng ngăn không cho dung môi chảy ra

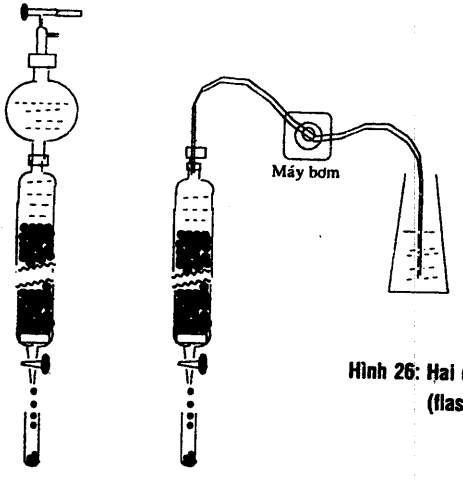
nữa. Nhúng đuôi ống của bình lóng (toàn phần đuôi lúc này phải chứa đầy dung môi) ngập sâu vào lớp dung môi ở đầu cột, chạm nhẹ vào mặt cát ở trên đầu cột. Mở nhẹ khóa bình lóng, dung môi từ từ thoát ra ngoài cho đến khi giảm áp suất trọng bình, gây nên ức chế dòng chảy, dung môi không chảy ra khỏi bình nữa. Khi quá trình sắc ký triển khai, một lượng dung môi trên đầu cột bị hút thấm xuống cột, mực dung môi trên đầu cột sẽ tụt xuống, sinh ra những bọt khí từ đáy bình lóng nổi lên nắp bình, tạo nên một áp suất nhỏ để đẩy một lượng thể tích tương ứng dung môi chảy ra khỏi bình để vào đầu cột.

Thực hiện như thế đến khi dung môi đi xuống đến đáy cột sắc ký thì ngưng, không cho dung môi chảy ra khỏi cột. (15 đến 30 phút)

- *Hiện hình sắc ký*: Đặt ống trụ nằm ngang, trên một tấm kiếng và quan sát bằng đèn UV, đánh dấu các đoạn. Lấy ống ra ngoài và dùng lưỡi dao lam để cắt ống thành những khúc thích hợp. Dùng dung môi để trích chất trong mỗi đoạn.

4.2. Sắc ký chớp nhoáng (Flash chromatography)[2; 7]

Do W. Clark Still đề nghị[7] để có thể tách nhanh trong 10-15 phút một hỗn hợp mẫu chất (từ 10 mg đến 10 gam) chứa những hợp chất mà sắc ký lớp mỏng cho các vết có $\Delta Rf \geq 0,15$. Thực hành như sắc ký cổ điển: *không được để cột khô dung môi.*



Hình 26: Hai dụng cụ sắc ký chớp nhoáng (flash-chromatography)

Bảng 10: Một số thông số cho sắc ký cột nhanh.

Đường kính Cột (cm)	Thể tích giải ly (ml)	Mẫu (mg) khi $\Delta Rf \geq 0,2$	Mẫu (mg) khi $\Delta Rf \geq 0,1$	Thể tích hứng một lọ (ml)
1	100	100	40	5
2	200	400	160	10
3	400	900	360	20
4	600	1600	600	30
5	1000	2500	1000	50

W. Clark Still đề nghị các thông số cho kỹ thuật sắc ký chớp nhoáng như sau

- *Chất hấp thu*: Kết quả thực nghiệm cho thấy sử dụng *silica gel có cỡ hạt 400-230 mesh tức là 40 - 63μm cho kết quả tốt nhất*. Nếu sử dụng loại silica gel có cỡ hạt mịn hơn, loại < 40 μm, kết quả vẫn thế, không tốt hơn. Sử dụng loại silica gel thông dụng 70-230 mesh (63-200 μm) cho kết quả xấu nhất.

- *Mô tả hệ thống*: (Hình 22, 26) Hệ thống gồm cột sắc ký bằng thủy tinh như hệ thống sắc ký cổ điển, chỉ thêm đầu cột được ráp nối với một hệ thống bơm nén (khí nén có áp lực trung bình), áp lực có thể điều chỉnh. Nhờ bơm, hơi nén từ trên đầu cột đẩy dung môi xuyên xuống lớp hấp thu nhanh hơn. Các thiết bị có thể tự chế hoặc có bán sẵn rất tiện dụng.

- *Lượng mẫu và kích thước cột*: Thực nghiệm cho thấy nên sử dụng cột ngắn, đường kính khoảng 1-10 cm và chiều dài không quá 40 cm. Các thông số liên quan giữa lượng mẫu và kích thước cột được trình bày trong bảng 10.

- *Vận tốc giải ly*: Mực dung môi hạ xuống trong ống với *tốc độ là 5 cm/ phút*.

- *So sánh với sắc ký cổ điển*: Ưu điểm nhờ khí nén đẩy dung môi giải ly nên thời gian triển khai nhanh hơn. Có thể tách rất tốt hỗn hợp có khoảng bốn hợp chất. Tuy nhiên, để thực hiện, cần phải có máy bơm nén khí và một bộ gồm những cột và những nắp vặn kín chuyên dùng, có kích thước từ nhỏ đến lớn. Những bộ này tương đối đắt tiền.

4.3. Sắc ký nhanh–cột khô (Dry-column flash chromatography; Vacuum liquid chromatography)[3, 4, 6]

Kỹ thuật sắc ký nhanh–cột khô được triển khai từ năm 1986 bởi hai nhóm nhà hóa học John C. Coll[3] và S. William Pelletier[6]. Hai ông đề nghị mô hình sắc ký này áp dụng cho các phòng thí nghiệm còn hạn hẹp trang thiết bị, có thể dễ dàng tìm thấy trong phòng thí nghiệm các dụng cụ cần thiết.

Sắc ký nhanh cột khô là một biến đổi của sắc ký chớp nhoáng, với một vài khác biệt như sau:

* Để gia tăng vận tốc giải ly của pha động, sắc ký chớp nhoáng sử dụng một lực đẩy từ trên đầu cột xuống, còn sắc ký nhanh–cột khô dùng một lực hút tạo chân không ở đầu ra của cột nhờ một máy bơm hút loại nhẹ.

* Sắc ký chớp nhoáng sử dụng pha tĩnh là (thí dụ) silica gel loại dùng cho sắc ký cột, nghĩa là hạt có kích cỡ 40 - 63μm, còn sắc ký nhanh–cột khô sử dụng silica gel loại dùng cho sắc ký lớp mỏng (Merck 60H hoặc 60G; tức cỡ hạt 15 - 40 μm) hoặc alumina loại dùng cho sắc ký lớp mỏng (10 μm, diện tích bề mặt riêng lớn: 500 $m^2.g^{-1}$)

* Trong quá trình giải ly, sắc ký chớp nhoáng vẫn giữ một lớp dung môi ở trên đầu cột (cột không được khô); còn với sắc ký nhanh, cột sắc ký được rút khô sau mỗi phân đoạn thu được.

4.3.1. Các dụng cụ cần thiết cho sắc ký nhanh–cột khô (hình 27)

• Phễu lọc xốp bằng thủy tinh với độ xốp của lỗ thuộc loại 2 hoặc 3 để cho dòng chảy của dung môi giải ly được thuận lợi (xem thêm phần phụ lục về độ lỗ xốp của phễu).

Đây là dụng cụ thủy tinh thông thường của bất kỳ phòng thí nghiệm nào. Phễu có đủ kích cỡ lớn nhỏ (loại 100ml, 150 ml, 250, 500 ml...) thích hợp để thực hiện lượng mẫu nhiều ít, như trình bày trong bảng 11.

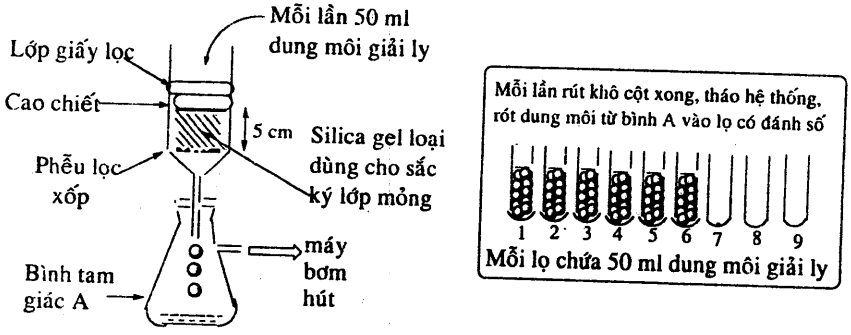
• Bình tam giác.

• Hệ thống tạo chân không nhẹ bằng vòi nước. Chỉ cần áp suất vừa phải, khoảng 20 -70 mmHg, không được áp suất mạnh vì sẽ làm dung môi bay hơi và có thể làm gãy cột.

4.3.2. Nạp chất hấp thu vào cột (phễu)

Ráp hệ thống gồm phễu lọc xốp, gắn trên bình tam giác và bình này nối với một máy bơm hút tạo chân không, như hình 27. Cho máy bơm chân không hoạt động và dùng muỗng múc từng lượng nhỏ silica gel khô (loại dùng sắc ký lớp mỏng, cỡ hạt 15 - 40 μm) cho vào phễu đến tận đáy, dùng nút thủy tinh có đáy bằng phẳng để nén ép nhẹ tay đè silica gel xuống đáy phễu. Mỗi lần một ít, từng lớp, tạo thành một khối rắn, đồng nhất, chặt chẽ, có bề mặt bằng phẳng.

Sau khi nạp pha tĩnh hoàn tất, lớp silica gel có chiều dầy chỉ được khoảng 5cm. Nếu cần tách một lượng mẫu chất nhiều hơn, sử dụng phễu to hơn, có đường kính lớn hơn. Đặc biệt lưu ý: lớp silica gel chỉ dầy tối đa là 5 cm (gia tăng theo đường kính, không tăng theo chiều cao).



Hình 27: Dụng cụ sắc ký nhanh - cột khô

Bảng 11: Mối liên quan giữa lượng mẫu và kích thước phễu trong sắc ký nhanh-cột khô

Lượng mẫu	Đường kính trong của phễu (cm)	Chiều cao lớp hấp thu (cm)	Phân đoạn dung dịch giải ly (ml)
< 100 mg	0,5–1,0	4	10–15
0,5–1,0 g	2,0–3,0	4	20–30
1,0–10,0 g	5	5	30–50
10,0–20,0 g	10	5	50

4.3.3. Cân bằng cột sắc ký

Sau khi nạp pha tĩnh xong, chỉnh lớp bề mặt pha tĩnh cho bằng phẳng, đặt một lớp bông gòn dầy lên trên bề mặt cột để bảo vệ lớp mặt.

Cân bằng cột bằng loại dung môi ít phân cực nhất, loại sẽ được dùng để giải ly đầu tiên. Cho một lượng lớn dung môi lên đầu cột, cho hệ thống tạo áp suất kém hoạt động, dung môi được hút đi xuống xuyên ngang qua cột rơi vào bình tam giác. Ngưng hệ thống để thu hồi lượng dung môi này để sử dụng trở lại và ráp hệ thống trở lại.

Thực hiện vài lần, đến khi thấy chất hấp thu trong cột đồng nhất.

4.3.4. Nạp mẫu lên đầu cột và giải ly cột

Có thể nạp mẫu theo kiểu nạp mẫu khô hoặc nạp mẫu ướt; thực hành như sắc ký cột cổ điển.

Trước khi nạp mẫu, lớp bông gòn bảo vệ bề mặt được tháo để riêng qua một bên, đặt mẫu sát lên mặt thoáng của silica gel, và đặt trả lại lớp bông gòn đè lên trên lớp mẫu, để bảo vệ lớp bề mặt của cột.

• Nạp mẫu ướt: Cột được hút khô (khô tương đối). Tắt áp suất kém. Mẫu được hòa tan trong dung môi ít phân cực nhất, được phủ đều lên khắp bề mặt của silica gel. Gắn áp suất kém, dung dịch mẫu được hút xuống, khẳn sâu vào phần silica gel ở đầu cột thành một lớp mỏng đều.

• Có thể nạp mẫu ở dạng bột khô (xem phần 3.4): Cho hết lượng bột mẫu khô phủ lên trên đầu cột, vừa khỏ nhẹ thành ngoài của phễu vừa dùng muỗng để trải đều phần bột này để có một lớp mỏng. Chú ý không được đè nén lớp bột này.

• Sau khi đã nạp mẫu lên đầu cột (ở đây là phễu), lấy lớp bông gòn lúc nãy phủ trở lại lên trên mặt cột, bề mặt này sẽ không bị xáo trộn khi rót dung môi giải ly lên.

4.3.5. Triển khai sắc ký (Giải ly)

Cho máy bơm tạo áp suất kém hoạt động. Rót một thể tích dung môi nhất định lên bề mặt phễu (Bảng 11), dung môi được hút xuống bình tam giác bên dưới. Chờ cho phễu khô tương đối, ngắt áp suất, rót phần dung dịch

vừa giải ly đang chứa trong bình tam giác vào các lọ có đánh số thứ tự. Gắn phễu vào hệ thống, rót dung môi, cho máy bơm hút hoạt động, hút khô phễu... ***Mỗi lần phải hút khô phễu rồi mới cho dung môi mới.***

4.3.6. Dung môi giải ly có tính phân cực tăng dần

Giải ly lần lượt từ dung môi không phân cực đến dung môi phân cực. Tăng dần tính phân cực của dung môi giải ly, cũng giống như sắc ký cột cổ điển.

Sau khi giải ly, dung môi được cho vào những lọ nhỏ có đánh số. Các lọ được kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng. Các lọ có kết quả sắc ký lớp mỏng cho vết giống nhau được gom chung lại với nhau thành một phân đoạn. Thu hồi dung môi sẽ thu được cắn.

Thực hiện cho đến khi hoàn tất sắc ký cột sẽ có nhiều phân đoạn.

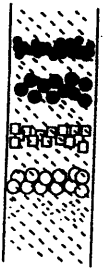
Ghi chú: Đôi khi mới bắt đầu giải ly, cột bị nghẹt, dung môi không hút qua được là do có hợp chất phân cực nào đó đã kết tinh lại khi gặp dung môi ít phân cực. Giải quyết bằng cách dùng một spatule khuấy xới trộn lớp bề mặt của cột lên một khoảng 0,5cm, rồi tiếp tục giải ly bình thường.

4.3.7. So sánh với sắc ký cổ điển

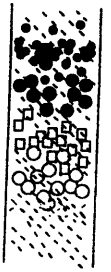
Với những cao chiết từ cây cỏ, có chứa rất nhiều hợp chất khác nhau, nên sẽ không có phương pháp sắc ký cột nào hiệu quả để chỉ một lần mà có thể tách riêng ra những đơn chất. Luôn luôn phải thực hiện nhiều lần sắc ký cột. Nhưng phải mất rất nhiều thời gian (nhiều ngày) để sắc ký cột trên một loại cao với lượng mẫu lớn.

Thực nghiệm cho thấy muốn tách 20 gam mẫu bằng sắc ký cột cổ điển cần phải thực hiện trong 3 tháng, liên tục ngày đêm không nghỉ. Nhưng kỹ thuật viên khó có thể thức cả ngày lẫn đêm trong nhiều ngày, nên đến tối phải nghỉ để sáng mai làm tiếp. Muốn nghỉ phải khóa cột lại. Trong khi đó, với quá trình sắc ký đã trải qua, các loại hợp chất có độ phân cực khác nhau đang tách riêng ra để tạo thành từng nhóm, nằm sắp xếp thành từng lớp khác nhau trong cột. Nếu ngưng cột giữa chừng, mà các chất này vẫn đang ở trong dung môi, chúng sẽ ***khuếch tán ra theo mọi hướng*** chứ không theo ***một***

hướng từ trên đi xuống do tác dụng của trọng lực, điều này đã làm xáo trộn vị trí sắp đặt của quá trình sắc ký (Hình 28).



Cột sắc ký



Theo quá trình sắc ký, dưới tác dụng của trọng lực, các loại hợp chất khác nhau đang tập trung tụ lại thành từng dãy sắp xếp nằm sắp lớp trong cột.

Khi ngưng lại giữa chừng, các loại hợp chất vẫn đang ở trong dung môi, do không còn chịu tác dụng của trọng lực, sẽ khuếch tán theo khắp mọi hướng, làm xáo trộn trật tự đã được thiết lập lúc trước

Hình 28: Hệ quả xảy ra khi cho sắc ký cột cổ điển ngưng lại giữa chừng

Hai nhóm nhà hóa học John C. Coll[3] và S. William Pelletier[6] đã đề nghị kỹ thuật sắc ký nhanh–cột khô để khắc phục các nhược điểm của sắc ký cột cổ điển.

Sắc ký nhanh-cột khô có các ưu điểm như sau:

* Dụng cụ dễ dàng tìm được trong bất kỳ phòng thí nghiệm hóa học nào: phễu lọc xốp, bình tam giác, vòi nước tạo áp suất kém hoặc máy bơm hút loại yếu....

* Thời gian sắc ký nhanh nhờ lực hút bên dưới để hút dung môi giải ly.

* Thuận tiện cho người thao tác: quá trình sắc ký có thể bị gián đoạn mà không bị ảnh hưởng. Khi muốn tạm dừng giữa chừng, hút khô cột, che chắn phần đầu cột để tránh bụi (đậy phễu bằng một tấm kiếng), khi nào rãnh sẽ lại thực hành tiếp. Silica gel được hút khô, mẫu chất ở trạng thái khô, nằm nguyên tại vị trí trong cột.

4.3.8. So sánh với kỹ thuật chiết pha rắn (Solid phase extraction, mục 2.2.7)

Chiết pha rắn chính là sắc ký nhanh–cột khô với các sự khác nhau và tương đồng như sau.

• Sự tương đồng: về mục đích yêu cầu; các dụng cụ lắp ráp; loại chất hấp thu sử dụng (silica gel dùng cho sắc ký lớp mỏng); các giai đoạn thao tác thực hiện...

• Sự khác nhau: duy nhất về độ phân cực của dung môi giải ly.

✳ Trong sắc ký nhanh–cột khô, độ phân cực của dung môi giải ly được điều chỉnh ***tăng dần dần***. Thí dụ giải ly bằng cloroform, nay muốn tăng độ phân cực, thêm 1; 2; 3; 5; 10; 50% etyl acetat vào cloroform.

✳ Trong chiết pha rắn, độ phân cực của dung môi giải ly được cho ***tăng đột ngột***. Thí dụ giải ly bằng eter dầu hỏa, tiếp theo là cloroform, kế đến là etyl acetat và sau cùng là metanol.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. **A. Braithwaite, F.J. Smith**. *Chromatographic methods*. Kluwer Academic Publishers. Boston-London, 45-501, 1999.

[2]. **Donald L. Pavia, Gary M. Lampman, George S. Kriz**. *Introduction to laboratory techniques. A contemporary approach*. Harcourt Brace College Publishers, Sydney, London, Tokyo. 600, 1988.

[3]. **John C. Coll, Bruce F. Bowden**. *The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpen mixture*. Journal of Natural Products. 49(5), 934-936, 1986

[4]. **Luc A.C. Pieters, Arnold J. Vlietinck**. *Vacuum liquid chromatography of tumor promoting diterpene esters*. Journal of Natural Products. 52(1), 186-190, 1989.

[5]. **Richard J.P. Cannell**. *Natural Products Isolation*. Humana Press, Totowa- New Jersey, 20-212, 1998

[6]. **S. William Pelletier, Hitesh P. Chokshi, Haridutt K. Desai**. *Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography*. Journal of Natural Products. 49(5), 892-900, 1986

[7]. **W. Clark Still, Michael Kahn; Abhijit Mitra**. *Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution*. J. Org. Chem., 43(14), 2923-2924, 1978

[8]. **Whatman**. *Advanced Ion Exchange Celluloses Laboratory Manual*. Whatman Chemical Separation Inc., England, 1981.

CÁC PHƯƠNG PHÁP CÔ LẬP HỢP CHẤT HỮU CƠ

Chương 4

SẮC KÝ LỚP MỎNG

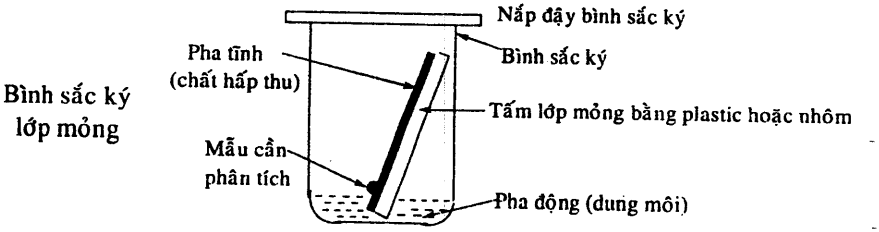
Kỹ thuật sắc ký đã được sử dụng từ nhiều thế kỷ trước để tách các phẩm nhuộm từ cây cỏ. Đến thập kỷ 1930-1940, phương pháp này được phát triển nhanh chóng với nhiều kỹ thuật khác nhau. Có các loại sắc ký: sắc ký giấy (kỹ thuật sớm nhất, hiện nay ít được sử dụng vì hiệu quả tách kém thua kỹ thuật sắc ký lớp mỏng), sắc ký lớp mỏng, sắc ký trao đổi ion, sắc ký lọc gel (gel permeation chromatography or size exclusion), sắc ký ái lực (affinity chromatography), sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography), điện di (capillary electrophoresis).

1. KIẾN THỨC TỔNG QUÁT VỀ SẮC KÝ LỚP MỎNG

Sắc ký lớp mỏng còn gọi là ***sắc ký phẳng*** (planar chromatography), dựa chủ yếu vào hiện tượng hấp thu trong đó pha động là một dung môi hoặc hỗn hợp các dung môi, di chuyển ngang qua một pha tĩnh là một chất hấp thu trơ, thí dụ như: silica gel hoặc oxid alumin. Pha tĩnh này được tráng thành một lớp mỏng, đều, phủ lên một nền phẳng như tấm kiếng, tấm nhôm hoặc tấm plastic. Do chất hấp thu được tráng thành một lớp mỏng nên phương pháp này được gọi là sắc ký lớp mỏng.

* Bình sắc ký: Một chậu, hũ, lọ... bằng thủy tinh, hình dạng đa dạng, có nắp đậy.

* Pha tĩnh: Một lớp mỏng khoảng 0,25 mm của một loại chất hấp thu, thí dụ như silica gel, alumin... được tráng thành một lớp mỏng, đều, phủ lên một nền phẳng như tấm kiếng, tấm nhôm hoặc tấm plastic. Chất hấp thu trên tấm giá đỡ nhờ sulfat calci khan, hoặc tinh bột, hoặc một loại polymer hữu cơ.



✳ Mẫu cần phân tích: Mẫu chất cần phân tích thường là hỗn hợp gồm nhiều hợp chất với độ phân cực khác nhau. Sử dụng khoảng 1 microlít (1 μL) dung dịch mẫu với nồng độ loãng 2-5%, nhờ một vi quản để chấm mẫu thành một điểm gọn trên pha tĩnh, ở vị trí phía trên cao hơn một chút so với mặt thoáng của chất lỏng đang chứa trong bình.

✳ Pha động: dung môi hoặc hỗn hợp hai dung môi, di chuyển chầm chậm dọc theo tấm lớp mỏng và lôi kéo mẫu chất đi theo nó. Dung môi di chuyển đi lên cao nhờ vào tính mao quản. Mỗi thành phần của chất mẫu sẽ di chuyển với mỗi vận tốc khác nhau, đi phía sau mực của dung môi. Vận tốc di chuyển này tùy thuộc vào các lực tương tác tĩnh điện mà pha tĩnh muốn níu giữ các mẫu chất ở lại pha tĩnh (hiện tượng hấp thu của pha tĩnh) và tùy vào độ hòa tan của mẫu chất trong dung môi.

Với chất hấp thu là silica gel hoặc alumin, các hợp chất kém phân cực sẽ di chuyển nhanh và các hợp chất rất phân cực di chuyển chậm.

1.1. So sánh sắc ký lớp mỏng với các kỹ thuật sắc ký khác

Sắc ký lớp mỏng có ưu điểm: sử dụng ít chất hấp thu, cần rất ít mẫu phân tích (vi lượng), quá trình triển khai sắc ký nhanh nên trong một thời gian ngắn có thể biết ngay kết quả mẫu cần phân tích có chứa bao nhiêu chất khác nhau.

So với phương pháp sắc ký lớp mỏng, phương pháp sắc ký cột cổ điển cho kết quả tệ hại do phải sử dụng một lượng lớn chất hấp thu, chất mẫu và dung môi nên quá trình thực hiện phải kéo dài, dẫn theo kết quả không tốt. Tiếp theo, kỹ thuật sắc ký lỏng mới là sắc ký cột chớp nhoáng (flash column chromatography) do có sử dụng thêm áp suất nên rút ngắn được thời gian thao tác và khả năng tách riêng các chất ra khỏi hỗn hợp ban đầu, đã cho kết

quả gần đạt được so với sắc ký lớp mỏng, tuy vậy vẫn mất thời gian. Những năm gần đây kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) cho kết quả nhanh, tốt, cả về mặt định tính lẫn định lượng nhưng máy rất đắt tiền, không phải phòng thí nghiệm nào cũng có khả năng trang bị.

Bảng 1: So sánh các đặc trưng của các kỹ thuật sắc ký.

	Sắc ký lớp mỏng	**Sắc ký cột cổ điển**	**Sắc ký cột chớp nhoáng**	**Sắc ký khí**	**Sắc ký HPLC**
Cơ chế sắc ký	Hấp thu / phân chia	Hấp thu	Hấp thu	Phân chia	Phân chia
Tính chất hợp chất đem đi phân tích	Dung dịch mẫu có tính *kém bay hơi*	Dung dịch mẫu có tính *kém bay hơi*	Dung dịch mẫu có tính *kém bay hơi*	Khí hoặc hơi của các hợp chất *có tính bay hơi*	Mẫu có tính *bay hơi nhiều hay ít đều phù hợp*
Khả năng tách chất	Đạt	Trung bình	Tốt	Rất tốt	Rất tốt
Thời gian tách chất	Vài phút đến vài giờ	Nhiều giờ	Vài mươi phút	Vài phút	Vài phút
Hiệu quả tách chất *định tính*	Rất tốt	Cần sắc ký vài lần	Cần sắc ký vài lần	Rất tốt	Rất tốt
Hiệu quả tách chất *định lượng*	Có thể	Cần sắc ký vài lần	Cần sắc ký vài lần	Rất tốt	Rất tốt
Khả năng tách lượng lớn mẫu	Có thể	Rất tốt	Rất tốt	Có thể, nhưng khó	Rất tốt

Sắc ký lớp mỏng có một số ưu điểm như sau:

- Chỉ cần một lượng rất ít mẫu để phân tích.

- Có thể phân tích đồng thời mẫu và chất chuẩn đối chứng, trong cùng điều kiện phân tích.

- Tất cả các hợp chất trong mẫu phân tích có thể được định vị trên tấm

sắc ký lớp mỏng; trong khi so với HPLC: những hợp chất có tính phân cực mạnh sẽ có sắc ký đồ ở dạng một mũi hấp thu rộng và dài, nên quan sát viên khó phân biệt được đó là một mũi (để chỉ sự hiện diện của một chất) hay chỉ là tạp bẩn.

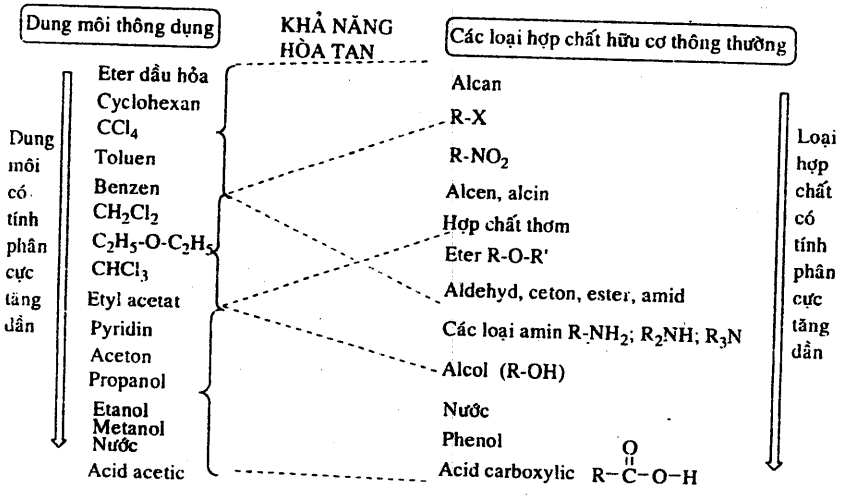
1.2. Sắc ký hấp thu

1.2.1. Độ phân cực của pha tĩnh và pha động

Trong quá trình sắc ký, sự tách chất dựa vào nguyên tắc là sự phân cực, nghĩa là dựa vào sự hiện hữu của lưỡng cực trong cấu trúc của phân tử.

- ***Sự phân cực của pha động*** (tức dung môi)

Khả năng giải ly của một chất lỏng, nghĩa là khả năng lôi kéo các hợp chất phân cực trong hệ thống sắc ký tùy vào độ phân cực của chính dung môi này. Vì lý do đó, các dung môi được sắp xếp theo thứ tự tính phân cực tăng dần như trình bày trong hình 1. Trong các dung môi này, dung môi hydrocarbon như eter dầu hỏa, hexan là dung môi không phân cực và acid acetic là dung môi rất phân cực. Người ta có thể pha trộn các loại dung môi trong hình 1 theo nhiều tỉ lệ khác nhau để có vô số loại dung môi mới với độ phân cực thay đổi đa dạng.



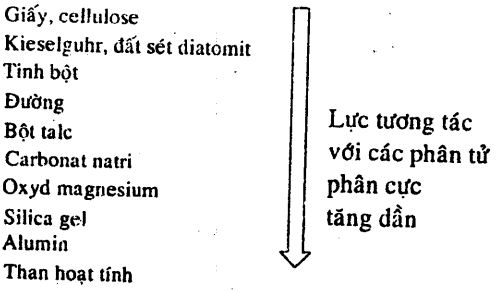
Hình 1: Khả năng hoà tan của các dung môi thông dụng

• ***Sự phân cực của pha tĩnh*** (chất hấp thu)

Các chất hấp thu cũng được sắp xếp theo lực tương tác của chúng đối với các hợp chất hữu cơ có tính phân cực. Các loại chất hấp thu sử dụng để tráng bản sắc ký lớp mỏng được trình bày trong hình 2, trong đó, silica gel và alumin là hai loại chất hấp thu thông dụng nhất.

Nói chung, than hoạt tính có khả năng hấp thu mạnh đối với các hợp chất phân cực. Cũng tương tự, silica gel hấp thu hợp chất acid carboxylic mạnh hơn hợp chất aldehyd, và hấp thu hợp chất eter mạnh hơn alcan. Thứ tự sắp xếp như trong hình 1 và 2 có tính chất tương đối và gần đúng, bởi vì người ta có thể xử lý các chất hấp thu để thay đổi tính chất và khả năng hấp thu của nó.

Về tổng quát, chất hấp thu càng ngậm nhiều nước thì khả năng hấp thu của nó càng yếu, ngược lại, nó càng chứa ít nước thì tính hấp thu càng mạnh. Cũng dựa vào tính chất này mà tác giả Brockmann đã sắp xếp hoạt độ của các chất hấp thu, gọi là thang độ BROCKMANN: chất hấp thu hoạt độ I rất hoạt tính (giữ mạnh các phân tử phân cực), chất hấp thu hoạt độ V có hoạt tính yếu nhất.



Hình 2: Khả năng tương tác với các phân tử phân cực của các loại chất hấp thu

1.2.2. Sự tương tác giữa hợp chất cần phân tích với pha tĩnh và pha động

Sự tương tác giữa các hợp chất của mẫu với dung môi giải ly và với pha tĩnh là yếu tố quyết định hiệu quả tách của sắc ký. Việc mà một chất tan (solute) được dung môi giải ly tách rời và mang đi xa trên bản mỏng (trong

sắc ký cột là di chuyển ra khỏi cột) tùy thuộc vào hai lực: lực hút của pha tĩnh đối với chất tan và lực lôi kéo của pha động (dung môi) đối với chất tan.

✳ ***Lực hút của pha tĩnh đối với chất tan***: Nếu chất tan là loại hợp chất trung tính, lực níu giữ của silica gel hoặc alumin đối với các hợp chất này tùy thuộc vào độ phân cực của dung môi giải ly, như trình bày trong hình 1.

Các chất tan có tính kém phân cực như hydrocarbon (alcan, alcen)... bị silica gel hoặc alumin hấp thu kém, còn các chất tan có tính phân cực mạnh như ester, alcol, acid carboxylic... bị silica gel/alumin hấp thu mạnh, giữ chặt.

Nói chung, các hợp chất có mang các nhóm định chức hóa học phân cực bị silica gel hút giữ chặt, theo như hình 3.

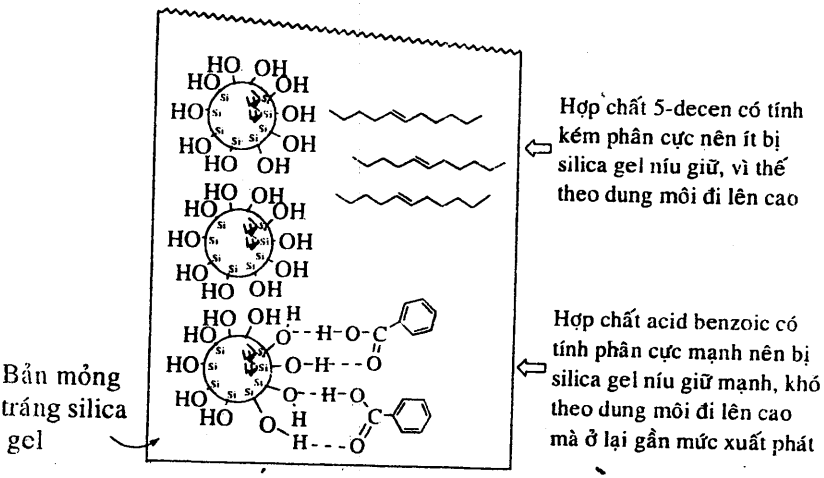
Khi mẫu phân tích là hợp chất có tính acid hoặc tính base, cần phải thận trọng khi chọn lựa pha tĩnh. Thực nghiệm cho thấy các hợp chất có tính acid bị pha tĩnh alumin giữ chặt và ngược lại, các hợp chất có tính base bị silica gel níu giữ rất mạnh. Trong thực tế, sử dụng alumin rất thích hợp để tách các hợp chất có tính base thí dụ các hợp *chất amin*... và silica gel rất hiệu quả để tách các hợp chất có tính acid như *phenol, acid carboxylic*...

✳ ***Lực lôi kéo của dung môi đối với chất tan***: Có hai loại lực xảy ra trong quá trình dung môi lôi cuốn chất tan.

Lực đầu tiên là nhờ độ hòa tan, nghĩa là mẫu cần phân tích có khuynh hướng hòa tan vào dung môi, nên khi dung môi di chuyển đến đâu thì mẫu chất bị lôi kéo theo đến đấy. Trong trường hợp này, dung môi phải hòa tan được chất tan và đủ hiệu quả để loại bỏ khả năng chất hấp thu muốn níu giữ mẫu chất lại.

Lực thứ nhì là ***hiện tượng thay thế chỗ*** (sự cạnh tranh chỗ): Trong trường hợp các phân tử mẫu chất có thể gắn vào pha tĩnh nhờ các đặc trưng như nối hydrogen, tương tác lưỡng cực..., nếu phân tử dung môi cũng có những đặc trưng trên, phân tử dung môi này sẽ cạnh tranh, giành lấy chỗ của pha tĩnh và đẩy phân tử mẫu chất rời xa pha tĩnh. Người ta nhận thấy các dung môi proton như etanol, metanol, acid acetic cạnh tranh giành chỗ trên silica gel đối với [illegible] phân cực rất hiệu quả.

Ứng dụng của hiện tượng trên là khi sắc ký lớp mỏng silica gel với những hợp chất có tính phân cực mạnh, thường cho vết kéo thành vệt dài; để khắc phục, chỉ cần thêm 1-2 giọt acid acetic vào hệ dung môi giải ly đang sử dụng (# 10ml) sẽ thấy vết hiện tụ gọn lại.



Hình 3: Minh hoạ tính hấp thu mạnh / yếu của pha tĩnh silica gel đối với các loại hợp chất có tính phân cực khác nhau

1.3 Các chất hấp thu dùng trong sắc ký lớp mỏng (xem lại chương sắc ký cột)

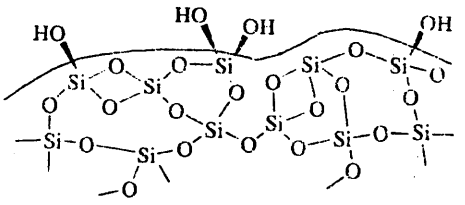
Tất cả các chất hấp thu sử dụng cho sắc ký cột đều có thể áp dụng cho sắc ký lớp mỏng, tuy nhiên điểm quan trọng cần lưu ý là kích cỡ của hạt và độ đồng nhất của các hạt hấp thu, vì điều này quyết định độ bám dính của chất hấp thu lên bề mặt tấm bản mỏng. Các hạt phải đồng đều và có đường kính trong khoảng 10 - 25µm. Trong kỹ thuật sắc ký cột, người ta không dùng cỡ hạt như trên vì hạt quá mịn, làm cản trở dòng chảy của dung môi giải ly.

Một số chất hấp thu dùng trong sắc ký lớp mỏng được trình bày trong bảng 2.

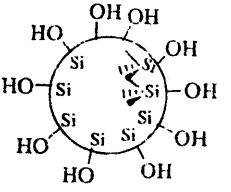
1.3.1. Silica gel

Silica gel là chất hấp thu được sử dụng thông dụng nhất. Cấu trúc hoá học của silica gel đã được trình bày trong chương sắc ký cột.

Trong silica gel thương phẩm, nếu có tiếp vĩ ngữ "G" nghĩa là silica gel có trộn thêm chất dính sulfat calci nửa phân tử nước [$CaSO_4$ (0,5 H_2O)]. Sự hiện diện của ion calci hầu như không cản trở quá trình sắc ký. Người ta thường trộn chất dính ở tỉ lệ 10% (w/w). Hiện nay, các tấm bản mỏng silica gel có cỡ hạt 10 µm, chiều dầy lớp tráng là 250µm, phù hợp để tách các hợp chất có trọng lượng phân tử 500-1000 Dalton. Có loại kỹ thuật mới là sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC) sử dụng silica gel cỡ hạt 5-6 µm sẽ gia tăng vận tốc và khả năng tách các chất.



Cấu trúc bề mặt silica gel



Hạt silica gel

Các tấm bản mỏng silica gel tráng sẵn thường có trộn thêm chất phát huỳnh quang, được ghi trên hộp là silica gel 60 F_{254}. Cũng có khi nhà sản xuất trộn thêm nitrat bạc giúp tách tốt hơn những hợp chất bất bão hòa nhất là các hợp chất alcen.

Loại silica gel G hoặc alumina G dùng cho sắc ký lớp mỏng, có cỡ hạt mịn, nên không thể sử dụng được cho sắc ký cột, vì trong cột, những chất hấp thu này sẽ kết chặt lại với nhau làm tắt dòng chảy của dung dịch giải ly.

Chất hấp thu cho sắc ký lớp mỏng cũng có thể là silica gel pha đảo, thường là C-2, C-8, C-12 và C-18. Khi pha tĩnh tráng silica gel C-18, pha tĩnh này có tính chất không phân cực, hấp thu mạnh các hợp chất không phân cực. Khi giải ly bản mỏng bởi loại dung môi phân cực, các chất phân cực của mẫu chất, do không bị pha tĩnh níu giữ mạnh, sẽ được giải ly đi lên trên cao, còn các chất không phân cực của mẫu chất sẽ ở vị trí thấp; nghĩa là thứ tự các loại hợp chất phân cực và không phân cực hiện diện trên bản có trật tự ngược lại với bản tráng silica gel thông thường. Phương pháp này được gọi là pha đảo (reversed phase).

So với sắc ký lớp mỏng pha thường, sắc ký lớp mỏng pha đảo có một số ưu điểm như: tính chọn lọc cao, tách tốt các hợp chất không phân cực, nhưng có giá tiền đắt gấp hai mươi lần.

Lớp mỏng dùng để tách hai đối phân: Pha tĩnh cho sắc ký lớp mỏng có thể là loại dùng để tách hai đối phân. Pha tĩnh là silica gel pha đảo có tẩm tác chất thủ tính là Cu(II) và dẫn xuất của prolin.

1.3.2. Kieselguhr (celite)

Kieselguhr là khoáng thiên nhiên. Thành phần của kieselguhr thay đổi tùy theo nguồn khoáng và quá trình tuyển khoáng. Phần lớn các loại khoáng kieselguhr đều chứa 10% là nguyên liệu kieselguhr còn khoảng 90% còn lại là SiO_2, Al_2O_3, Fe_2O_3, MgO, Na_2O, K_2O, CaO, TiO_2 ở các tỉ lệ khác nhau.

Nguyên liệu này là những hạt có độ rỗng lớn, có diện tích bề mặt lớn, có tính chất hấp thu rất nhỏ. Vì những đặc tính nêu trên, nguyên liệu này được sử dụng để làm pha tĩnh cho kỹ thuật sắc ký phân chia. Trong sắc ký lớp mỏng, người ta hay trộn thêm sulfat calci 15%.

1.3.3. Alumina

Alumina là chất hấp thu mạnh, hoạt động như một chất ion lưỡng cực tuỳ theo dung môi sử dụng (vì alumina có loại kiềm, trung tính hoặc acid).

Alumina kiềm, khi sử dụng với dung môi hữu cơ, sẽ hấp thu các chất thơm, hydrocarbon bất bão hòa, carotenoid, steroid, alcaloid và nhiều loại hợp chất tự nhiên khác. Trong dung dịch nước hoặc dung dịch alcol-nước, đặc tính trao đổi của nó càng rõ nét hơn, nên nó có thể hấp thu các hợp chất như: phẩm nhuộm có tính kiềm, amino acid có tính kiềm, cation vô cơ.

Alumina trung tính sử dụng chủ yếu với các dung môi hữu cơ, thích hợp để tách các chất dễ bị hỏng.

Alumina acid dùng để tách các hợp chất có tính acid hoặc trung tính với điều kiện các chất này không bị hủy hoại bởi acid. Trong môi trường nước hoặc alcol, alumina acid được dùng như chất trao đổi ion.

Alumina có thể xúc tác các phản ứng nội phân tử hoặc liên phân tử, nhất là với các hợp chất có tính nhạy cảm với kiềm. Thí dụ: phản ứng khử

nước, sự dịch chuyển nối đôi, sự mở rộng vòng... Điều này khiến các nhà hóa học chuộng sử dụng silica gel hơn.

1.3.4. Bột giấy (cellulose powder)

Thoạt tiên, người ta nghĩ rằng không cần sử dụng bản mỏng tráng bằng bột giấy vì có thể sử dụng trực tiếp sắc ký giấy, tuy vậy bản mỏng tráng bằng bột giấy có ưu điểm riêng. Trong giấy, cellulose có dạng sợi, các sợi này khi nằm cạnh nhau sẽ tạo thành mạng lưới với các lỗ rỗng to. Khi giải ly, dung môi di chuyển dọc theo bề mặt sợi và các lỗ rỗng sẽ được phủ đầy dung môi. Như thế, các chất tan bị phân tán nhiều trong lỗ rỗng khiến cho các vết sắc ký sẽ to hơn. Nếu các sợi được nén quá chặt, vận tốc dòng chảy sẽ rất chậm. Ngược lại, các lớp bột cellulose là sự tủa của những hạt cực mịn, cùng cỡ nên các khe hở nhỏ và đồng đều nên dung môi giải ly di chuyển đều đặn, sự tách hiệu quả hơn. Bột giấy hấp thu nước, nước bị giữ trong cấu trúc glucopyranose bằng nối hydrogen, vì thế quá trình sắc ký xảy ra theo cơ chế phân chia.

Sắc ký sử dụng nguyên liệu cellulose chủ yếu để tách các hợp chất háo nước (hydrophilic) thí dụ như: amino acid, đường, ... trái ngược với silica gel hay alumina dùng để tách các hợp chất kỵ nước (hydrophobic).

Có nhiều loại dẫn xuất khác nhau của cellulose được nhà sản xuất điều chế để sử dụng như những chất trao đổi ion.

a) Cellulose dietylaminoetyl (DEAE): do phản ứng giữa cellulose với 2-cloro-1-dietylaminoetyl, clorhydrat (Cellulose-OH + $ClCH_2COONa \rightarrow$ Cellulose - OCH_2COONa)

DEAE hoạt động như một chất trao đổi anion mạnh và DEAE mang điện tích dương khi ở môi trường pH trung tính hoặc acid. Nó được sử dụng trong kỹ thuật sắc ký trao đổi ion để tách những hợp chất mang điện tích âm. Do đặc tính háo nước nên DEAE thường được sử dụng để tách các protein, acid nucleic.

b) Cellulose carboxymetyl (CM): từ sự tổng hợp acid monocloroacetic với cellulose, được sử dụng như một chất trao đổi cation yếu.

$$\text{Cellulose-OH} + ClCH_2CH_2N(C_2H_5)_2 \rightarrow \text{Cellulose-}OCH_2CH_2N(C_2H_5)_2$$

1.3.5. Lớp polyamid

Người ta cũng tráng bản bằng polyamid thường là polyamid 6 hoặc polyamid 11. Thí dụ polyamid 6 là polycaprolactam hoặc Nylon 6.6 (tức là polyhexametylendiaminoadipat), còn polyamid 11 là polyundecanamid.

Loại này dùng để tách các hợp chất có tính phân cực nghĩa là các hợp chất có thể tạo nối hydrogen với nối amid, nên người ta thường dùng để tách các chất như amino acid, acid carboxylic, hợp chất phenol.

1.3.6. Sephadex (R)

Nguyên liệu để tráng bản mỏng là gel dextran tạo mạng ngang. Sephadex (R) có nhiều kích cỡ hạt (gel khô) nhưng chỉ có loại hạt cực mịn (10-40 μm) mới phù hợp để tráng bản. Lớp mỏng tráng lên tấm kiếng là những hạt cực mịn của gel Sephadex có cỡ hạt 10-40 μm, bề dầy lớp mỏng là 0,4 -1,0 mm.

Sephadex (R) chỉ được sử dụng để tách chất sau khi đã được làm trương nở hoàn toàn, bởi vì chúng được sử dụng như là loại sắc ký lọc gel (lọc theo kích thước). Người ta thường sử dụng loại gel này để xác định nhanh trọng lượng phân tử của các protein. Loại sắc ký này tiến hành rất chậm và dễ gây nhiều rắc rối, tuy vậy cho kết quả tốt hơn là sắc ký lọc gel bằng cột.

Bảng 2: Một vài loại Sephadex (R) sử dụng trong sắc ký lớp mỏng.

Loại Sephadex ®	Khả năng hấp thu nước (ml/g)	Tách chất theo trọng lượng phân tử (Dalton)
G-25	2,5 ± 0,2	100 – 5.000
G-50	5,0 ± 0,3	500 – 10.000
G-75	7,5 ± 0,5	1.000 – 50.000
G-100	10,0 ± 1,0	5.000 – 100.000
G-200	20,0 ± 2,0	5.000 – 200.000

1.4. Chất cho thêm vào (additives)

Các chất hấp thu thương mại đều có trộn hoặc không trộn thêm chất kết dính hoặc chất chỉ thị phát huỳnh quang. Chất kết dính giúp cho hấp thu bám tốt vào tấm kiếng hoặc tấm plastic, hoặc giúp cho lớp mỏng thêm bền, không bị trầy sước.

Tuy vậy, đôi khi cũng có một vài nhược điểm, thí dụ khi chất bám dính là tinh bột hoặc là một vài loại nguyên liệu có nguồn gốc polimer: ở giai đoạn làm hiện hình các vết trên tấm bản bằng những dung dịch tác chất có tính ăn mòn, tấm bản mỏng sẽ bị hư hại. Tấm lớp mỏng có trộn thêm chất bám dính sulfat calci sẽ không phù hợp khi giải ly bằng dung môi là nước lý do sulfat calci hòa tan nhẹ trong nước.

Với silica gel, người ta thường trộn thêm 10% (w/w) sulfat calci [$CaSO_4$ (0,5 H_2O)] để giúp bám dính trên bản mỏng. Trong thương mại, các nhà sản xuất ký hiệu là silica gel G. Sự hiện diện của ion calci hầu như không làm cản trở quá trình sắc ký.

1.5. Dung môi giải ly

Các đơn dung môi được sắp xếp theo tính phân cực tăng dần theo hằng số điện môi (dielectric constant) hoặc momen lưỡng cực hoặc các chỉ tiêu khác, được trình bày trong bảng 3 và bảng 4.

Thứ tự sắp xếp độ phân cực của dung môi trong các tài liệu tham khảo đôi khi có chênh lệch nhau do các tác giả đã đo độ phân cực của dung môi theo những tiêu chí khác nhau.

Nguyên tắc chọn dung môi: Nên chọn loại dung môi rẽ tiền, vì phải cần một lượng lớn, có độ tinh khiết cao, tránh có chứa các vết kim loại. Dung môi không được quá dễ bay hơi, thí dụ etyl eter, nhiệt độ sôi # 35°C, gần bằng nhiệt độ của phòng thí nghiệm vào mùa nóng (miền nam Việt Nam). Dung môi dễ bay hơi sẽ dễ dàng bay đi khỏi tấm lớp mỏng sau khi giải ly.

Bảng 3: Các dung môi có tính phân cực tăng dần dựa vào hằng số điện môi.

Dung môi	Nhiệt độ sôi (°C)	Hằng số điện môi ε (ở 25°C)	Momen lưỡng cực μ (Debye)
Pentan		1,8	0,0
n-Hexan	68,8	1,9	0,0
Ciclohexan	80,8	2,0	0,0
Tetraclorur carbon CCl_4	76,7	2,2	0,0
1,4-Dioxan	101,4	2,2	0.4
Trietylamin $(CH_3CH_2)_3N$	89,0	2,4	0,8
Benzen	80,1	2,3	0,0
Toluen C_6H_5-CH_3	110,6	2,4	0,4
Sulfur carbon CS_2	46,2	2,6	0,0
Dietyl eter $CH_3CH_2OCH_2CH_3$	34,6	4,2	1,2
Dimetylsulfoxid (Viết tắt là DMSO)	189,0	4,7	3,9
Cloroform	61,2	4,7	1,1
Clorobenzen	132,0	5,6	1,5
Piperidin	106,0	5,8	1,1
Etyl acetat	77,1	6,0	1,8
Acid acetic	118,5	6,2	1,5
Anilin	184,4	7,0	1,5
Tetrahydrofuran (Viết tắt là THF)	65,4	7,4	1,7
Diclorometan	39,8	8,9	1,5
Tert- butanol	82,5	12,2	1,7
Pyridin	115,5	12,3	2,2
Aceton	56,2	20,7	2,7
Etanol	78,3	24,3	1,7
Benzonitril C_6H_5-CN	190,7	25,2	3,9
Metanol	65,0	32,6	1,6
Dimetylformamid (Viết tắt là DMF)	153,0	36,7	3,8
Acetonitril CH_3-CN	81,6	37,5	3,5
Nước	100,0	78,5	1,8
Nitrometan CH_3-NO_2	101,1	38,6	3,1

Bảng 4: Các dung môi được sắp xếp theo tính phân cực tăng dần, dựa vào lực dung môi giải ly ε^0 xác định trên alumin.

Dung môi	$\varepsilon^0 Al_2O_3$
n-Pentan	0,00
n- Hexan	0,01
n- Heptan	0,01
Cyclohexan	0,04
Disulfur carbon CS_2	0,15
Tetraclorur carbon CCl_4	0,18
Isopropyl eter	0,28
2-Cloropropan	0,29
Toluen	0,29
1-Cloropropan	0,30
Clorobenzen	0,30
Benzen	0,32
Bromoetan	0,37
Dietyl eter	0,38
Cloroform $CHCl_3$	0,40
Diclorometan CH_2Cl_2	0,42
Tetrahydrofuran	0,43

Dung môi	$\varepsilon^0 Al_2O_3$
1,2-Dicloroetan	0,49
Etyl metyl ceton	0,51
Aceton	0,56
Dioxan	0,56
Etyl acetat	0,58
Metyl acetat	0,60
1-Pentanol	0,61
Dimetylsulfoxid	0,62
Anilin	0,62
Nitrometan	0,64
Acetonitril	0,65
Pyridin	0,71
2-Propanol	0,82
Etanol	0,88
Metanol	0,95
Etylen glycol	1,11
Acid acetic	>> 1

Một mẫu chất cần phân tích có chứa nhiều cấu tử khác nhau. Khả năng tách riêng các hợp chất này bằng sắc ký lớp mỏng tùy thuộc vào tỉ lệ phân phối của các hợp chất này giữa chất hấp thu và dung môi giải ly. Muốn thay đổi khả năng tách, người ta thay đổi thành phần các dung môi sử dụng để giải ly. Thường người ta giải ly với hỗn hợp hai dung môi, khả năng giải ly tăng mạnh dần của các loại hỗn hợp dung môi được trình bày trong bảng 5.

Về nguyên tắc tổng quát, nếu có thể, nên tránh sử dụng hỗn hợp dung môi có nhiều hơn hai cấu tử, vì hỗn hợp phức tạp như thế dễ dàng dẫn đến việc thay đổi pha khi có sự thay đổi nhiệt độ.

Sự lựa chọn dung môi để tách tốt các chất khác nhau vẫn tùy vào kinh nghiệm cá nhân, nhưng những hiểu biết về đặc tính của hợp chất cần phân tích sẽ giúp ích cho người nghiên cứu.

Bảng 5: Các hỗn hợp hai dung môi được sắp xếp theo khả năng giải ly tăng dần. Sắp xếp từ trên xuống dưới; hết cột bên trái, tiếp theo cột bên phải. (Chỉ có giá trị đối với những chất hấp thu có tính ái nước).

Hệ dung môi	Tỉ lệ pha
Benzen	
Benzen: cloroform	1: 1
Cloroform	
Cyclohexan: etyl acetat	8: 2
Cloroform: aceton	95: 5
Benzen: aceton	9:1
Benzen: etyl acetat	8: 2
Cloroform: dietyl eter	9: 1
Benzen: metanol	95: 5
Benzen: dietyl eter	6: 4
Cyclohexan: etyl acetat	1: 1
Cloroform: dietyl eter	8: 2
Benzen: aceton	8: 2
Cloroform: metanol	99 : 1
Benzen: metanol	9: 1
Cloroform: aceton	85: 15
Benzen: dietyl eter	4: 6
Benzen: etyl acetat	1: 1
Cloroform: dietyl eter	6: 4

Hệ dung môi	Tỉ lệ pha
Cyclohexan: etyl acetat	2: 8
Butyl acetat	
Cloroform: metanol	95: 5
Cloroform: aceton	7: 3
Benzen: etyl acetat	3: 7
Butyl acetat: metanol	99: 1
Benzen: dietyl eter	1 : 9
dietyl eter: metanol	99: 1
dietyl eter	
Etyl eter: dimetylformamid	99: 1
Etyl acetat	
Etyl acetat: metanol	99 : 1
Benzen: aceton	1 : 1
Cloroform: metanol	9 : 1
Dioxan	
Aceton	
Metanol	
Dioxan: nước	9 : 1

2. CÁC CHUẨN BỊ TRƯỚC KHI SẮC KÝ LỚP MỎNG

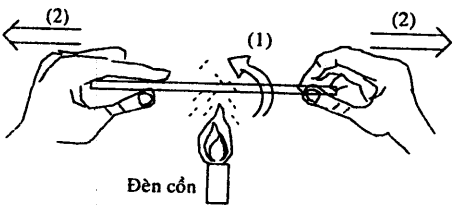
2.1. Chuẩn bị vi quản

Vi quản là một ống thủy tinh có đường kính trong của ống phải nhỏ, khoảng 1-2 mm, một đầu được vót nhọn. Các nhà sản xuất có bán sẵn các vi quản có khắc độ trên thành ống để tiện biết thể tích dung dịch sử dụng.

Trong phòng thí nghiệm, sinh viên có thể tự kéo vi quản cho mình. Lấy một ống thủy tinh có đường kính 1-2 mm, dài 10-20 cm (loại dùng để đo điểm nóng chảy). Hai tay cầm 2 đầu ống, hơ đoạn giữa ống trên một đèn cồn, vừa hơ vừa xoay vòng vòng để khoảng vùng chính giữa của ống được nóng đều. Khi nhận thấy thủy tinh mềm dẻo có vẻ như muốn nóng chảy, dùng hai ngón tay nắm hai đầu ống kéo dang ra xa (về hai phía), thủy tinh của ống sẽ dãn dài ra. Nhớ hai tay vẫn luôn giữ hai đầu ống, chờ đến khi thủy tinh nguội, đông cứng lại mới thôi, nếu không, ống còn nóng sẽ chảy còng queo.

Mỗi sinh viên chỉ cần chuẩn bị một vài cây vi quản có chiều dài vừa tầm lòng bàn tay. Một ống vi quản có thể sử dụng để chấm nhiều loại mẫu dung dịch khác nhau, chỉ cần sau mỗi lần sử dụng, rửa sạch vi quản bằng dung môi hữu cơ thí dụ như aceton.

(1): Hai tay cầm vi quản hơ trên ngọn lửa xanh của đèn cồn và vừa xoay tròn để vi quản nóng chảy đều.
(2): Khi thấy vi quản vừa nóng chảy: vừa đem vi quản tránh khỏi ngọn lửa, vừa kéo hai đầu ống dang ra xa; rồi giữ yên cho đến khi thủy tinh đặc cứng trở lại



Dùng một lọ thủy tinh nhỏ, chứa một ít aceton để dành rửa vi quản. Khi aceton trong lọ hết, thì châm mới thêm một ít. Lọ này có nắp bằng nhựa. Soi thủng nắp nhựa một lỗ sao cho vừa đủ lọt ống vi quản. Khi cần chấm mẫu, rút vi quản ra khỏi lọ aceton, dí nhẹ đầu vi quản lên một tờ giấy thấm để hút bỏ aceton đang có trong ống, nhúng đầu vi quản vào dung dịch mẫu cần sắc ký để chấm lên bản sắc ký. Tiếp theo, muốn dùng vi quản đó để chấm vào dung dịch mẫu thứ nhì thì rửa ống vi quản vài lần với aceton: nhúng vi quản vào lọ aceton, rút ra và dí vi quản lên tờ giấy thấm, rồi lại rửa với aceton... thực hiện vài ba lần là vi quản sạch để tiếp tục làm việc với mẫu dung dịch khác.

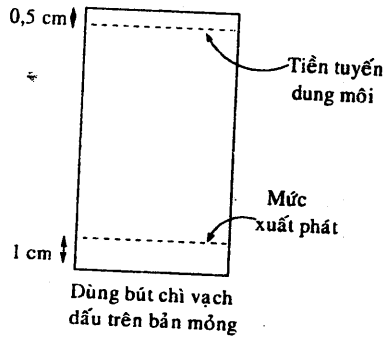
Không nên kéo vô số ống vi quản để mỗi cây vi quản cho một loại dung dịch: rất phí thời giờ, mà các ống dùng rồi nếu vô ý vứt bừa bãi dễ gây tai nạn cho người khác, vừa mất công đổ bỏ.

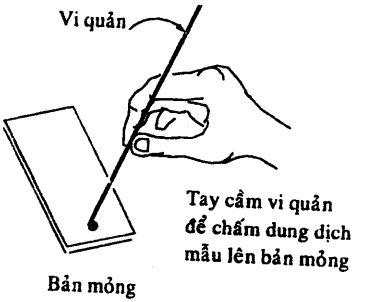
2.2. Chấm mẫu lên tấm bản mỏng

✳ *Chuẩn bị tấm bản mỏng*: Với các bản dùng để theo dõi sắc ký cột có thể tiết kiệm với bản có chiều dài 5 cm. Với bản dùng để đo Rf, để sau này công bố kết quả, nên có chiều dài 10 cm.

Từ tấm bản mỏng thương mại 20x20 cm, dùng kéo cắt các bản với kích thước cần thiết. Lưu ý sao cho tấm bản mỏng phải lọt được vào bình giải ly.

Dùng bút chì để vạch nhẹ các nét mức xuất phát và mức tiền tuyến dung môi.





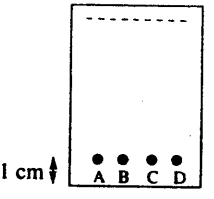
✳ *Chuẩn bị dung dịch mẫu*: Với mẫu là chất lỏng, có thể chấm trực tiếp mẫu lên bản mỏng; trường hợp đây là dung dịch quá sệt, có thể pha loãng mẫu. Với mẫu là chất rắn, phải hòa tan hoàn toàn mẫu trong dung môi hữu cơ phù hợp, với nồng độ 2-5%; dung môi hòa tan mẫu không nhất thiết phải là dung môi giải ly.

Nhờ một vi quản, đặt dung dịch mẫu lên bề mặt của tấm sắc ký lớp mỏng một cách thận trọng, tránh không làm lũng bề mặt của lớp mỏng. Thao tác: cầm vi quản (hoặc một ống nhỏ có khắc độ bằng thủy tinh để rút dung dịch) nhúng vào dung dịch mẫu, lực mao dẫn sẽ tự hút dung dịch lên vi quản, rồi đặt đầu vi quản chạm nhẹ lên bề mặt của tấm lớp mỏng, dung dịch trong

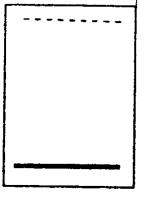
ống sẽ chảy ra và thấm lên tấm lớp mỏng. Phải nhanh chóng nhấc vi quản rời khỏi tấm lớp mỏng, để vết chấm chỉ lan rộng ra thành vết tròn có đường kính từ 2-5mm.

Sắc ký lớp mỏng *là phương pháp định tính* vì thế mỗi vết chấm trên bản không nên chứa nhiều hơn 12 µg (10 µg là tối ưu) mẫu chất. Với một mẫu, có thể chấm nhiều lần, nhưng giữ cho vết chấm đừng lan rộng ra trên bản, vết phải có đường kính từ 2-5mm; muốn thế, sau mỗi lần chấm, dùng miệng thổi hơi nhẹ hoặc dùng máy sấy nhẹ để dung môi bay đi khỏi vết chấm, rồi mới chấm tiếp theo vài lần nữa cho đến khi đủ lượng cần cho một vết chấm.

Sau khi chấm hoàn tất, dùng *máy sấy nhẹ để dung môi bay đi khỏi vết chấm*, rồi nhúng bản vào dung dịch giải ly; điều này đặc biệt cần thiết nếu dung dịch pha mẫu là nước hoặc loại dung môi có độ bay hơi kém.



Mỗi mẫu chấm một vết
Các vết cách nhau 1 cm.
A và D cách bìa 1,5 cm



Có thể chấm mẫu thành một vệt dài nhưng nhớ vẫn phải chừa hai bên lề

Nếu cần khảo sát một lượt nhiều mẫu khác nhau, chuẩn bị các dung dịch mẫu này, mỗi dung dịch mẫu chấm một chấm lên cùng một bản, vết này cách vết kia 1 cm. Hai vết ở ngoài bìa phải cách bờ cạnh 1,5 cm (đối với bản có kích thước 20 x 20cm).

Với bản sắc ký lớp mỏng điều chế, dung dịch chất mẫu sẽ được chấm lên bản thành một đường dài, đều, dọc theo mức xuất phát. Có thể áp dụng khoảng 10 mg cho một bản có kích thước 20 x 20cm và chiều dầy bản 5 mm. Trên mức tiền tuyến dung môi (cách bờ cạnh trên 0,5-1 cm), nên dùng một đầu viết chì vót nhọn vạch một đường hằn xuống lớp hấp thu. Làm như thế, khi dung môi giải ly đi lên đến đầu trên sẽ bị buộc phải ngừng lại, giúp cho mỗi bản sẽ có kết thúc giống như nhau.

Khi dung môi lên đến đầu trên của bản, không nên để bản ở lâu trong bình; nên lấy bản ra khỏi bình giải ly, vì sự khuếch tán và sự bay hơi dung môi có thể làm các vết vừa tách được sẽ bị trải dài ra.

Ngoài ra, các nhà sản xuất có bán sẵn các thiết bị tự động để chấm mẫu lên lớp mỏng. Các loại thiết bị này giúp chấm dung dịch mẫu lên lớp mỏng với lượng thể tích xác định chính xác.

2.3. Giải ly bản mỏng

2.3.1. Chuẩn bị bình giải ly bản mỏng

Chuẩn bị bình có kích thước lớn hơn một chút so với kích thước của bản mỏng. Kích thước của bình và lượng thể tích dung môi giải ly sẽ ảnh hưởng lên giá trị Rf của mẫu. Cần sử dụng bình nhỏ nhất *nếu có thể* vì như thế bầu khí quyển sẽ nhỏ nhất.

Cho dung môi hoặc hỗn hợp dung môi vào bình. Với sắc ký lớp mỏng định tính, chỉ cần một thể tích khoảng 10 ml dung môi. Quan sát chiều dầy của lớp dung môi trong bình giải ly: không được cao quá 1 cm, bởi vì các vết chấm mẫu trên bản mỏng cách bìa là 1 cm.

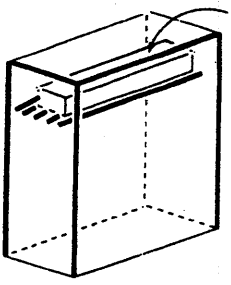
Nếu sắc ký lớp mỏng với các tấm bản lớn, sử dụng bình lớn, phải tính toán thể tích dung môi cần dùng để chiều dầy của lớp dung môi trong bình không cao hơn khoảng cách của vết chấm trên bản mỏng (vết chấm trên bản mỏng không được ngập vào trong dung môi khi vừa mới thả bản vào bình).

Trước khi cho tấm bản mỏng vào bình, bình cần được bão hòa dung môi để có một bầu khí quyển đồng nhất, thực hiện bằng cách phủ *bề mặt trong* của bình bằng một tờ giấy lọc, nghiêng đảo nhẹ bình giải ly để dung môi thấm ướt tờ giấy lọc. Một hậu quả dễ thấy là nếu bình không được bão hòa dung môi, khi dung môi giải ly là hệ hỗn hợp, mức tiền tuyến dung môi sẽ có hình lõm (hình lòng chảo) do dung môi đi ở hai bên cạnh nhanh hơn đi ở giữa bản.

Đặt tấm bản mỏng vào bình triển khai, cạnh đáy của bản ngập vào dung dịch giải ly khoảng 0,5-1,0 cm. Hệ dung môi dung ly phù hợp là sau khi giải ly, hệ sẽ cho *các vết chính* có Rf khoảng từ 0,3 đến 0,6.

2.3.2. Các kỹ thuật giải ly bản mỏng: *Có nhiều phương pháp triển khai sắc ký lớp mỏng*

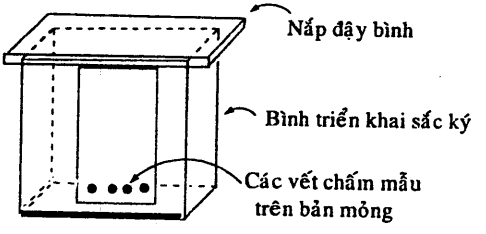
Bình giải ly cho bản cỡ lớn, giải ly với kỹ thuật dung môi đi xuống



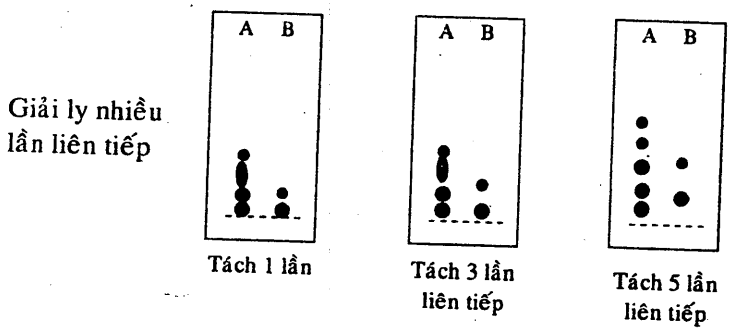
a) Giải ly để dung môi giải ly di chuyển xuống: Trong kỹ thuật này, sau khi bình đã bão hòa dung môi, người ta đặt tấm lớp mỏng vào bình khai triển, để cho các vết chấm mẫu ở phía trên cao, gần với nắp đậy bình. Ở phía trên cao của bình triển khai, có một máng nhỏ chứa dung môi giải ly. Người ta cho một tờ giấy lọc (có chiều ngang bằng với chiều ngang của tấm lớp mỏng) vắt ngang từ máng qua tấm lớp mỏng, để dung môi từ máng di chuyển đến cạnh đầu trên của tấm lớp mỏng, rồi đi xuống dưới thấp.

b) Giải ly để dung môi giải ly di chuyển lên: Sau khi bình đã bão hòa dung môi, người ta đặt tấm lớp mỏng vào bình khai triển, để cho các vết chấm mẫu ở bờ cạnh phía dưới gần đáy bình. Cạnh đáy của tấm lớp mỏng ngập vào dung dịch giải ly khoảng 0,5-1,0 cm. Lưu ý: các vết mẫu không được ngập vào dung môi giải ly, vì như thế mẫu sẽ khuếch tán ngay lập tức vào dung môi. Các vết này phải cách mặt thoáng của dung môi khoảng 0,5 cm; nghĩa là các vết mẫu phải được chấm cách bờ cạnh khoảng 1,0 cm.

Kỹ thuật giải ly kiểu dung môi đi lên nhờ lực mao dẫn

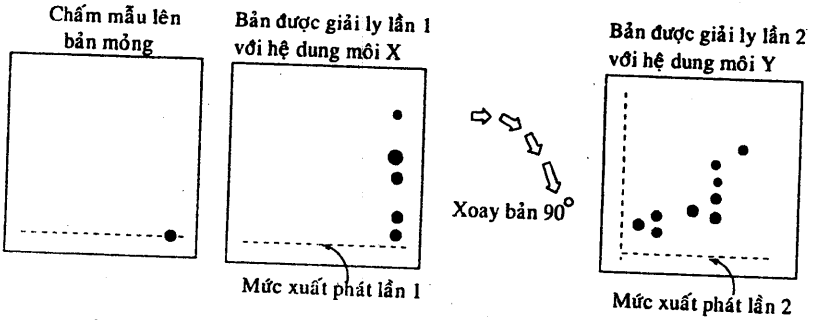


c) Giải ly nhiều lần liên tiếp: Kỹ thuật được áp dụng để tách mẫu có chứa các hợp chất có Rf gần sát với nhau, thực hiện bằng cách giải ly nhiều lần liên tiếp với cùng một loại dung môi đã chọn. Mỗi lần giải ly xong, lấy bản ra, sấy khô và cho vào trở lại để giải ly lần nữa.



d) Giải ly hai chiều: Kỹ thuật triển khai hai chiều rất phù hợp đối với mẫu là hỗn hợp nhiều nhóm hợp chất có tính chất khá khác nhau (và trong mỗi nhóm lại có chứa nhiều hợp chất có tính chất gần giống nhau).

Kỹ thuật giải ly hai chiều



Trên tấm sắc ký bản mỏng hình vuông, thí dụ 20 x 20 cm, chấm dung dịch mẫu cần phân tích lên ở góc phải, cách hai bìa một khoảng 2-3 cm (nhớ lưu ý vết chấm sẽ nằm ở vị trí cao hơn mặt thoáng của dung môi), giải ly với hệ dung môi X. Lấy bản ra, sấy khô, và xoay bản 90°, đặt trở lại vào bình sắc ký để được giải ly, nhưng với hệ dung môi khác, là Y.

Quan sát bản mỏng nhận thấy: lần giải ly đầu tiên, bản tách ra cho thấy hỗn hợp có chứa năm hợp chất. Lần giải ly thứ nhì cho thấy một số vết của

lần tách đầu lại tiếp tục tách ra thêm một số chất nữa và hỗn hợp có chứa đến chín hợp chất.

Lưu ý: bản mỏng là loại sắc ký với độ phân giải thấp, nếu sau khi giải ly, quan sát trên bản thấy có một vết không có nghĩa là một chất. Sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC là loại sắc ký với độ phân giải cao sẽ giúp kết luận số lượng hợp chất có trong mẫu chính xác hơn.

3. THỰC HÀNH TRÁNG SẮC KÝ LỚP MỎNG

3.1. Chuẩn bị tráng tấm bản mỏng

Có thể sử dụng tấm bản mỏng bán sẵn. Các nhà sản xuất thường bán các hộp sắc ký lớp mỏng, mỗi hộp 25 tấm, khổ 20 cm x 20cm. Chất hấp thu được tráng lên một giá đỡ, giá này có thể rắn chắc hoặc mềm dẻo, có thể là tấm kiếng, tấm nhôm, tấm bằng nhựa dẻo. Với các tấm bản mỏng thương mại, chất hấp thu được phun bằng áp lực, nên nó bám rất chặt trên bề mặt giá đỡ tạo thành một lớp mỏng có bề dầy đều đặn (dầy khoảng 0,3 mm), bề mặt đồng nhất, khả năng tách chất rất tốt.

Trong phòng thí nghiệm, có thể sử dụng kéo để cắt tấm lớn nói trên thành nhiều tấm nhỏ với kích thước tùy ý, phù hợp với bình triển khai sắc ký. Cũng có thể tự tráng lấy lớp mỏng để sử dụng.

Tấm giá đỡ để tự tráng thường là tấm kiếng. Các tấm kiếng có đủ kích thước, chỉ cần dùng dao cắt tấm kiếng lớn thành những tấm nhỏ với kích thước cần thiết, rồi mài giũa các cạnh cho tà để thao tác sau này được an toàn.

Trước khi tráng, rửa kỹ tấm kiếng bằng chất tẩy rửa, rồi bằng nước; để ráo nước và làm khô. Cũng có thể rửa đợt chót bằng aceton, nhưng điều này không bức thiết; điều quan trọng là sau khi rửa sạch xong, không được chạm ngón tay lên bề mặt tấm kiếng.

Chuẩn bị chất hấp thu bằng cách cho chất hấp thu vào nước theo tỉ lệ **x** gam chất hấp thu hòa trong **2 x** ml nước. Khuấy chậm đều để có một khối đồng nhất, không lợn cợn, không bọt khí. Tổng thời gian khuấy (thí dụ cho một bản 20 x 20cm với 25g silica gel G và 50 ml nước cất) *không lâu quá 100*

giây. Ngay lập tức, trải dung dịch này lên tấm mỏng theo một trong những cách trình bày tiếp sau.

Nếu có dùng thêm chất bám dính, thời gian mất bốn phút kể từ khi khuấy trộn hỗn hợp đến lúc hoàn tất trải dung dịch lên tấm lớp mỏng. Có thể điều chỉnh đặc tính của chất hấp thu bằng cách sử dụng các dung dịch đệm, giúp cho lớp hấp thu mang tính acid mong muốn. Cũng có thể trộn thêm các chất chỉ thị phát huỳnh quang hoặc trộn thêm nitrat bạc để bản mỏng sẽ tách tốt các hợp chất béo và các chất tương tự.

Độ dầy của lớp mỏng là yếu tố quan trọng nhất. Độ dầy chuẩn của lớp mỏng là 250 μm. Với sắc ký lớp mỏng điều chế, độ dầy của lớp khoảng 0,5–2,0 mm. Điều quan trọng là bề mặt các tấm này phải phẳng, không có những chỗ lồi lõm bất thường.

3.2. Các kỹ thuật tráng tấm lớp mỏng

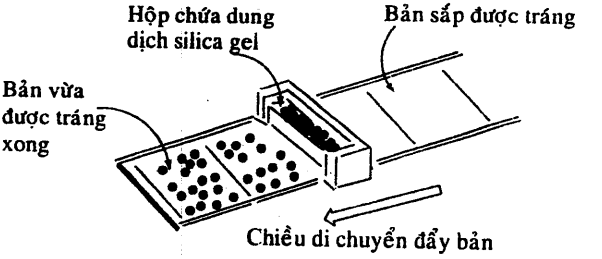
Có bốn cách để tự tráng chất hấp thu lên bản mỏng.

3.2.1. Trải (Spreading)

Có nhiều cách trải nhưng đều có chung một mục đích là làm sao để đạt được một lớp đồng đều gắn chặt lên tấm giá, không có chỗ đóng cục cũng như không có lỗ rỗng do bọt khí.

Các nhà sản xuất có bán sẵn dụng cụ dùng để tráng bản. Các tấm kiếng (thường có kích thước 20x20 cm) được xếp nằm kề nhau, cạnh sát cạnh, giữ chặt trong một khung phẳng bằng kim loại không rỉ. Khung này có mang một khối hộp nhỏ hình chữ nhật, có bốn cạnh, nhưng không có đáy. Hộp được đặt lên một tấm kiếng, nhưng có một gờ để kê cao lên, cho hộp này cách tấm kiếng một khoảng trống (khoảng này sẽ là chiều dầy của lớp hấp thu tráng phủ lên tấm kiếng). Cho dung dịch hấp thu vào hộp, kéo hộp dọc theo khung, từ đầu khung này đến đầu khung kia; dung dịch trong hộp chữ nhật sẽ trải đều lên các tấm kiếng. Để yên ngoài không khí các tấm kiếng vừa được tráng xong, cho đến khi ráo mặt và sấy trong tủ sấy.

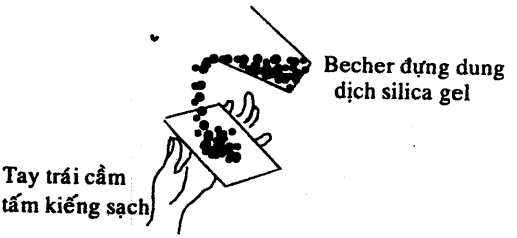
Máy tráng bản bán tự động



3.2.2. Rót (Pouring)

Nhiều nhà hóa học không thích sử dụng thiết bị tráng. Họ thấy rằng nếu sử dụng chất hấp thu loại mịn, đều, không sử dụng thêm chất làm dính, thì người ta dễ dàng rót dung dịch hấp thu lên tấm bản mỏng. Muốn tráng bản: đặt bản trong lòng bàn tay trái, giữ cho các ngón tay đừng chạm vào thành ngang của bản (vì các ngón tay sẽ dính silica gel một khi silica gel đã nằm trên bề mặt), rót hết dung dịch silica gel lên bề mặt bản, rồi nghiêng nhẹ bản qua bên trái rồi qua bên phải để dung dịch silica gel phủ đều lên khắp bề mặt của bản.

Tráng bản mỏng bằng phương pháp rót



Thông thường, kỹ thuật này dễ dàng áp dụng cho các chất hấp thu như silica gel, alumina, tuy nhiên nếu chỉ dùng nước để trộn chất hấp thu thì đôi khi không đạt được một hỗn hợp huyền phù đồng nhất. Người ta chuộng sử dụng etanol-nước hoặc etyl acetat.

Muốn biết số lượng chất hấp thu và dung môi cần để tráng đủ một tấm bản, phải tráng thử trước một vài bản. Khi có được một bản tráng đạt yêu cầu thì những lần sau phải sử dụng đúng tỉ lệ đã thử.

3.2.3. Phun (Spraying)

Cũng có thể sử dụng thiết bị để phun xịt hỗn hợp sệt dung dịch hấp thu lên tấm bảng, nhưng kỹ thuật này dường như không tốt hơn, hơn nữa không cho biết được độ dầy của chất phủ, và không cho các bản tráng có cùng độ dầy.

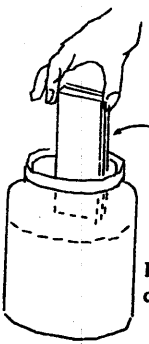
3.2.4. Nhúng (Dipping)

Có thể sử dụng kỹ thuật nhúng bản đối với các tấm bản có kích thước nhỏ, thí dụ như những tấm kính nhỏ (lame) dùng để nhìn mẫu chất qua kính hiển vi.

Chất hấp thu có thể được hòa trong nước, khi nhúng, muốn cho chất hấp thu bám tốt vào bản, nên hòa chất hấp thu vào dung môi dễ bay hơi như: diclorometylen, cloroform, aceton... Số lượng tối ưu là khoảng 3 ml diclorometylen cho mỗi gam silica gel G sẽ cho dung dịch huyền phù hấp thu.

Có thể nhúng một lần hai bản bằng cách kẹp hai bản sát vào nhau, sử dụng hai ngón tay để cầm phần đầu trên của hai bản, nhúng bản vào huyền phù, nhớ chừa lại phần bản đang được giữ bởi các ngón tay. Ngâm trong huyền phù khoảng hai giây rồi kéo bản lên chầm chậm ra khỏi dung dịch. Giữ yên một phút để dung dịch huyền phù rỏ xuống lọ và để phần lớn dung môi bay đi, tách hai bản ra riêng, đặt lên một tờ giấy thấm, để khô tự nhiên trong 5-10 phút ngoài không khí. Nếu chất hấp thu được hòa vào nước, sau khi lấy bản ra khỏi dung dịch, cần phải sấy bản ở 100°C trong vòng 30 phút.

Tráng bản bằng phương pháp nhúng



Sau khi tráng bản xong, nếu muốn lưu giữ trong một thời gian ngắn, thì cất bản trong bình hút ẩm, còn nếu muốn trữ bản trong thời gian dài, không cần phải để trong bình hút ẩm, chỉ cần giữ bản trong một hộp đậy kín.

Kỹ thuật này cũng không cho biết được độ dầy của chất hấp thu tráng trên bản và có khi độ dầy cũng không đồng đều, tuy nhiên kỹ thuật này tiện lợi vì có thể tráng được nhiều bản trong một thời gian ngắn.

3.3. Hoạt hóa chất hấp thu

Hoạt tính của một chất hấp thu (tức khả năng giữ các loại chất giải ly) được xác định bằng cấu trúc hóa học và các đặc tính của nó. Thí dụ trong silica gel, có nhiều loại nhóm hoạt động thông qua nhóm OH, *trong đó các nhóm silanol nằm ở trên bề mặt của silica gel, giữ vai trò chủ yếu.* Các chất cần sắc ký sẽ được hấp thu lên trên bề mặt của silica gel, bằng cầu nối hydrogen nối đến các nhóm silanol nằm ở trên bề mặt của silica gel (trong cầu nối hydrogen, các nhóm silanol là chất cho hydrogen). Silica gel thường được xử lý bằng cách nung đến 120 -150°C để đuổi hết nước, để cho các nhóm hoạt động trên bề mặt silica gel được hoạt hóa. Tuy nhiên, khi bị nung lên 400-500°C, silica gel sẽ bị giảm hoạt, vì nếu nung như thế, hai nhóm silanol nằm kề nhau sẽ bị loại một phân tử nước, như thế làm mất đi nhóm silanol hoạt động nằm trên bề mặt của silica gel.

Người ta chưa hiểu rõ bản chất các vị trí hoạt động của chất hấp thu alumina, tuy nhiên, trái ngược với silica gel, hoạt tính của alumina sẽ tăng khi gia tăng nhiệt độ nung, đôi khi lên đến 1000°C. Nhiệt độ tối ưu để hoạt hóa alumina chưa được xác định rõ, nhưng almina hoạt hóa hoàn toàn khi nung ở 400-450°C, trong 12-16 giờ.

Độ hoạt tính của alumina được xác định theo thang Brockmann. Hoạt tính của alumina có thể được điều chỉnh ***giảm*** xuống bằng cách thêm một lượng nước chính xác vào bột alumina chứa trong một erlen đậy kín, lắc đều trong vài giờ.

Alumina hạng I được điều chế bằng cách nung 400-450°C trong 12-16 giờ

Alumina hạng II là alumina được thêm vào 3% nước

Alumina hạng III là alumina được thêm vào 6% nước.

Alumina hạng IV là alumina được thêm vào 10% nước.

Alumina hạng V là alumina được thêm vào 15% nước.

Người ta có thể đánh giá hoạt tính của lớp hấp thu bằng sắc ký lớp mỏng: tráng alumina (không có thêm chất dính) lên những tấm kính, thành một lớp dầy 0,6mm. Trên mỗi tấm kiếng, chấm một chấm 0,02ml của dung dịch *p*-metoxyazobenzen hoặc vàng sudan, hoặc đỏ sudan, hoặc *p*-aminoazobenzen (20 mg trong 50 mlCCl_4), hoặc azobenzen (30 mg trong 50 ml CCl_4). Giải ly bản mỏng bằng CCl_4. Đo giá trị Rf của những chất màu sẽ biết được hoạt tính của alumina (bảng 6).

Bản tráng bằng silica gel cũng được phân loại theo thang Brockmann. Cả hai loại chất hấp thu silica gel và alumina sau một thời gian tồn trữ và nhất là khi để ngoài không khí, sẽ hấp thu hơi ẩm của không khí và xuống hạng vì thế cần trữ bản trong bình hút ẩm.

Bảng 6: Giá trị Rf của các phẩm màu trên lớp mỏng để xác định hoạt tính alumina theo thang Brockmann.

Phẩm màu	Hoạt độ II	Hoạt độ III	Hoạt độ IV	Hoạt độ V
Azobenzen	0,59	0,74	0,85	0,95
Metoxyazobenzen	0,16	0,49	0,69	0,89
Vàng sudan	0,01	0,25	0,57	0,78
Đỏ sudan	0,00	0,10	0,33	0,56

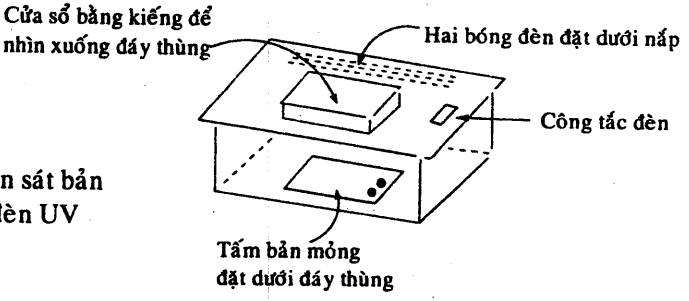
3. 4. Hiện hình các vết sau khi giải ly

Sau khi giải ly xong, các hợp chất có màu sẽ được nhìn bằng mắt thường, nhưng phần lớn các hợp chất hữu cơ không có màu, nên nếu muốn nhìn thấy các vết, cần sử dụng phương pháp hóa học hoặc vật lý.

3.4.1. Phương pháp vật lý

Có nhiều phương pháp khác nhau nhưng phương pháp thông dụng nhất là phát hiện bằng tia tử ngoại (UV). Các nhà sản xuất có bán sẵn dụng cụ để khảo sát bản mỏng bằng tia UV. Dụng cụ đơn giản gồm một thùng rỗng, được bao phủ chung quanh bằng vật liệu màu đen để tạo phòng tối; trên nắp thùng

có gắn hai bóng đèn UV với hai loại bước sóng là χ = 254 nm và 366 nm. Thùng có cửa mở ở bên hông. Muốn nhìn bản bằng đèn UV: mở cửa, đặt tấm bản mỏng vào bên trong, ở đáy thùng, đóng cửa lại, bật công tắc cho đèn sáng và quan sát tấm bản mỏng từ bên ngoài, từ trên cao nhìn xuống ngang qua một cửa sổ bằng kiếng.



Dụng cụ quan sát bản mỏng bằng đèn UV

• *Đèn chiếu tia UV 254 nm*: Ánh sánh này để nhận ra các hợp chất có thể hấp thu tia UV. Các hợp chất sẽ tạo thành vết có màu tối sẫm.

Nếu sử dụng bản mỏng thương mại thí dụ silica gel 60 F 254, bản mỏng này là silica gel có trộn thêm chất chỉ thị phát huỳnh quang (silicat kẽm có Mn hoạt hóa) hấp thu ánh sáng ở bước sóng 254 nm, như vậy dưới ánh sáng 254nm, tấm bản sẽ có màu xanh lục sáng chói. Nếu trên tấm bản có một vết của hợp chất mà hợp chất này cũng hấp thu ánh sáng ở bước sóng 254 nm, vết này sẽ che mất huỳnh quang, xuất hiện là một vệt tối trên nền sáng.

• *Đèn chiếu tia UV 366 nm*: Ánh sáng này dùng để phát hiện những hợp chất có phát huỳnh quang. Các vết của chất mẫu có màu sáng trên nền bản mỏng sẫm màu.

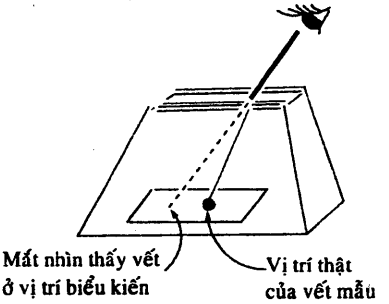
• Một số điểm cần lưu ý

✳ Có thể thay thế dụng cụ nêu trên bằng máy kiểm tra tiền, nhưng khi sử dụng cần cẩn thận vì máy này không có thùng che chắn tia UV giống như dụng cụ nói trên, nhưng biết rằng tia UV có thể gây đột biến gen.

✳ Bản mỏng với chất hấp thu có trộn thêm chất chỉ thị phát huỳnh quang ***có thể*** gây nên sự thay đổi vị trí của các vết trên bản: vết ở đúng vị trí này nhưng lại nhìn thấy vết ở vị trí khác, điều này gây nên những nhầm lẫn

tai hại (trình bày trong phần sắc ký lớp mỏng điều chế và xem thêm phần phụ lục, sự khúc xạ của ánh sáng).

Chiết xuất khác nhau giữa vùng không khí bên ngoài và bên trong thùng dụng cụ đo UV, khiến cho tia sáng nhìn từ mắt quan sát viên bị lệch.
Quan sát viên nhìn thấy vết ở vị trí biểu kiến của nó.



3.4.2. Phương pháp hóa học

Phương pháp hóa học là phát hiện các vết bằng thuốc thử, bằng cách hòa thuốc thử vào một dung môi thích hợp rồi phun xịt dung dịch thuốc thử này lên bản mỏng. Thuốc thử sẽ kết hợp với các hợp chất để tạo ra các dẫn xuất có màu. Các thuốc thử được xếp thành hai loại: đặc trưng và không đặc trưng.

Thuốc thử không đặc trưng khi nó tạo vết có màu hầu hết với tất cả các loại hợp chất hữu cơ, thí dụ như: iod, acid sulfuric, rhodamin B, chất chỉ thị phát huỳnh quang.

Thuốc thử đặc trưng khi nó chỉ tác dụng với những hợp chất có chứa những nhóm chức hóa học đặc biệt, tạo vết có màu đặc trưng. Thí dụ: thuốc thử dinitrophenylhydrazin tác dụng với những hợp chất có chứa nhóm carbonyl để tạo màu đỏ đậm.

Một vài thí dụ được trình bày trong bảng 7.

Bảng 7: Một vài thuốc thử hiện hình sắc ký lớp mỏng.

Thuốc thử	Màu của vết	Hợp chất
Hơi iod	Vàng hoặc nâu	Hợp chất hữu cơ nói chung. Hợp chất bất bão hòa
2,7-Fluorescein	Lục-vàng	Đa số các hợp chất hữu cơ

Ninhydrin	Tím-hồng	Amino acid, amin
2,4-Dinitrophenylhydrazin	Đỏ- cam	Aldehyd, ceton
Clorur antimony	Màu đặc trưng	Steroid, hợp chất chi hoàn. Vitamin, carotenoid
Bromophenol blue; Bromocresol green	Vàng	Acid carboxylic
Diphenylcarbazid	Màu đặc trưng	Kim loại

Có rất nhiều loại thuốc thử đặc trưng cho những hợp chất hữu cơ khác nhau.

* *Hợp chất hữu cơ*: Rất nhiều loại hợp chất hữu cơ cho hiện hình màu vàng-nâu sậm khi xử lý bản mỏng với hơi iod. Thao tác bằng cách cho bản mỏng vào trong một bình đậy kín, bên trong có chứa vài tinh thể iod hoặc phun xịt tấm bản mỏng với dung dịch 0,5% iod trong cloroform. Trong đa số trường hợp, iod chỉ bám một cách cơ học lên bản, chớ không tạo phức với chất hữu cơ; vì thế, sau khi hiện hình bản bằng hơi iod, để bản ngoài không khí một thời gian, hơi iod sẽ bay khỏi bản, không còn nhìn thấy vết nữa. Lưu ý: với hợp chất có mang nhiều nối đôi C=C, hơi iod bám dính chặt luôn.

* *Các loại hydrocarbon*: Để phát hiện tất cả các loại hydrocarbon, sử dụng thuốc thử vạn năng $KMnO_4/H_2SO_4$ (0,5g $KMnO_4$ trong 15 ml H_2SO_4 đậm đặc, mỗi lần chỉ nên pha một lượng nhỏ dung dịch vì lượng lớn có thể gây nổ). Thuốc thử cho vết mẫu màu trắng trên nền bản màu hồng.

* *Các halogenoalcan*: Được phát hiện bằng dung dịch nitrat bạc. Dung dịch thuốc thử sẽ tạo với mẫu để cho halogenur bạc, dưới tác dụng của ánh sáng, vết sẽ biến thành màu sậm.

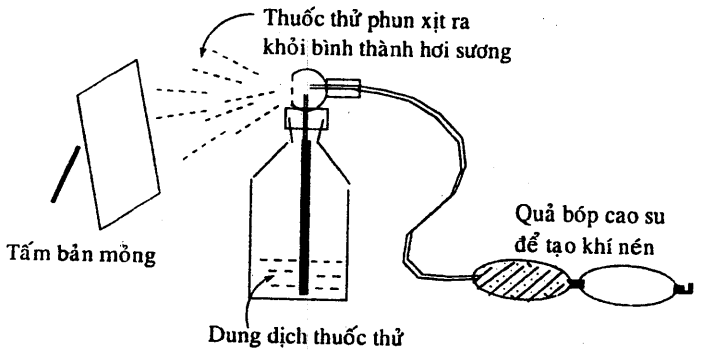
* *Các aldehyd, ceton:* Dung dịch thuốc thử 2,4-dinitrophenylhydrazin tác dụng với aldehyd, ceton tạo thành dẫn xuất 2,4-dinitrophenylhydrazon cho vết màu vàng đến cam, đỏ tùy cấu trúc của hợp chất carbonyl.

3.4.3. Phun xịt dung dịch thuốc thử lên bản mỏng

Muốn khảo sát các hợp chất trên bản mỏng bằng các thuốc thử đặc trưng, phải thấm bản mỏng với dung dịch thuốc thử, có thể thực hiện theo hai cách.

✳ Phun xịt bản mỏng bằng bình phun xịt. Thuốc thử pha theo qui định và cho vào bình, thể tích thuốc thử chỉ được chiếm tối đa hai phần ba thể tích chứa của bình. Sử dụng khí nén hoặc dùng một ống bóp cao su để tạo sức nén, giúp dung dịch đi ra khỏi bình ở dạng giọt sương mịn. Phải bóp vài cái trước để tạo ra các giọt sương đều, rồi mới hướng đầu ra của bình vào tấm bản mỏng, sao cho hơi sương phủ đều lên bề mặt bản mỏng.

Phương pháp có ưu điểm là dung dịch thuốc thử được sử dụng với lượng vừa đủ để tạo phản ứng màu với hợp chất trên bản mỏng, nhược điểm là cần có thao tác khéo léo chuyên nghiệp nếu không, dung dịch thuốc thử được phủ lên bản không đều, chỗ nhiều gây loang lỗ, chỗ ít không đủ để làm xuất hiện vết.



✳ Nhúng bản mỏng vào một lọ có chứa dung dịch thuốc thử. Ưu điểm của phương pháp này là dung dịch thuốc thử có thể phủ đều lên mặt bản; nhược điểm là các chất mẫu nằm trên bản, khi gặp một lượng lớn thuốc thử, chúng sẽ hòa tan luôn vào thuốc thử, có thể biến mất khỏi bản. Sau mỗi lần nhúng bản vào dung dịch, một lượng nhỏ chất hấp thu silica gel sẽ rơi vào dung dịch, sau một thời gian, đáy bình chứa đầy silica gel, do đó phải thay dung dịch mới.

Thường sau khi phun xịt dung dịch thuốc thử lên bản mỏng hoặc nhúng bản vào dung dịch thuốc thử, cần phải xúc tiến phản ứng bằng cách sấy nóng bản mỏng cho đến khi các vết xuất hiện.

3.4.4. Lưu giữ vết để làm tài liệu

Sau khi giải ly bản, cần ghi lại những thông tin cần thiết. Các chi tiết có thể ghi lên mặt trước của bản bằng bút chì, hoặc ghi lên mặt sau bằng bút benzen. Các chi tiết như: dung môi giải ly, giá trị Rf của mẫu chất, hình dạng, màu sắc của vết, thuốc thử dùng để hiện hình các vết....

Tờ bản mỏng cần được lưu trữ bằng cách bảo quản trong một bao plastic. Nhưng nếu để lâu, bản cũng sẽ bị phai màu hoặc hư hỏng. Tốt nhất là đối với các bản quan trọng cần phải lưu tài liệu, có thể làm các cách như sau:

- Đặt tấm bản mỏng dưới một tờ giấy trong, dùng bút chì tô lại các vết đậm, nhạt, vị trí vết...

- Photocopy lại tấm bản mỏng.

- Tốt nhất là chụp hình màu để lưu lại hình ảnh nguyên tấm bản với đầy đủ màu sắc của các vết.

4. CÁC CÔNG DỤNG CỦA SẮC KÝ LỚP MỎNG

Sắc ký lớp mỏng là công cụ cần thiết cho các nghiên cứu viên trong phòng thí nghiệm, trong một số công việc như sau:

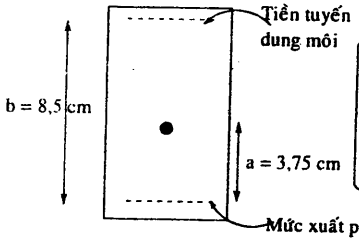
4.1. Để công bố đặc điểm của hợp chất vừa chiết tách cô lập

Để công bố các đặc điểm của một hợp chất, bên cạnh các số liệu phổ RMN, các đặc tính vật lý như điểm nóng chảy (hoặc nhiệt độ sôi), năng lực triền quang... cũng cần cho biết giá trị R_f của hợp chất đó.

Một hợp chất tinh khiết có một vết với sắc ký lớp mỏng, với giá trị R_f không đổi, trong một hệ dung môi dung ly xác định, bởi bản sắc ký của một lô sản xuất nhất định.

* Muốn đo R_f: sử dụng thước để đo khoảng đường di chuyển của hợp chất và của dung môi. Thực hiện bài toán chia, kết quả R_f là con số không có đơn vị, luôn luôn nhỏ hơn một ($R_f < 1$). Qui ước viết R_f với hai con số lẻ sau

dấu phẩy.



$$R_f = \frac{a}{b} = \frac{\text{Đoạn đường di chuyển của hợp chất}}{\text{Đoạn đường di chuyển của dung môi}}$$

$$R_f = \frac{a}{b} = \frac{3,75\ cm}{8,5\ cm} = 0,4411 = 0,44$$

Nếu vết mẫu hiện trên bản mỏng là một vết tròn, nhỏ, đo khoảng cách từ mức xuất phát đến tâm của vết đó. Nếu vết mẫu quá to, phải thực hiện sắc ký bản mỏng lại, giảm lượng mẫu chấm, sao cho vết hiện nhỏ, gọn.

✳ Giá trị Rf của một hợp chất thay đổi tùy theo nhiều yếu tố:

- Loại bản mỏng silica gel hoặc alumina của hãng Merck hay Prolabo (bản mỏng tráng sẵn dù của cùng một hãng sản xuất cũng khác nhau tùy theo lô sản xuất)

- Hoạt độ của bản lúc sử dụng khác nhau tùy theo thời gian tồn trữ lâu, mau.

- Độ dầy của bản.

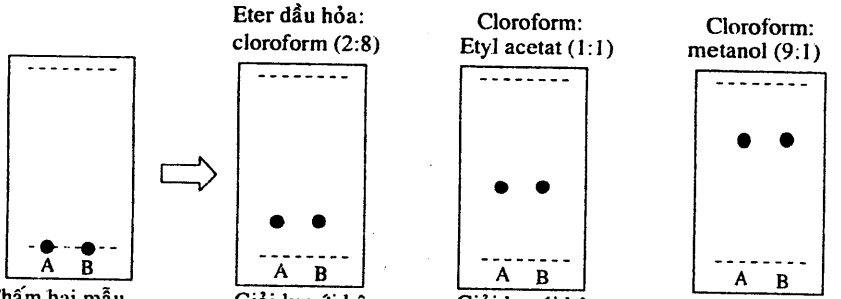
- Thành phần của dung môi dung ly, chỉ cần thay đổi một ít cũng làm ảnh hưởng kết quả. Độ bão hòa dung môi trong bình giải ly của hai lần giải ly khác nhau cũng khác nhau.

- Kỹ thuật giải ly: dung môi đi lên hay đi xuống cũng cho kết quả khác nhau.

- Lượng mẫu chấm lên bản nhiều hay ít cũng làm vị trí của vết trên bản thay đổi.

4.2. Để kiểm tra xem hai hợp chất có giống nhau (là một chất?)

Tuy rằng R_f của một chất có thể thay đổi theo nhiều yếu tố, nhưng có thể sử dụng R_f để so sánh xem hai hợp chất có giống nhau hay không, vì khi chấm hai mẫu lên trên cùng một bản mỏng thì các yếu tố vừa nói trên đã không còn ảnh hưởng.



Chấm hai mẫu lên cùng một bản, Hai vết có cùng nồng độ

Giải ly với hệ dung môi sao cho vết đi gần trên bản

Giải ly với hệ dung môi sao cho vết đi trung bình trên bản

Giải ly với hệ dung môi sao cho vết đi xa trên bản

Chuẩn bị ba bản giống nhau. Chấm trên mỗi bản: một vết mẫu đang cần nghiên cứu (thí dụ vết A) và vết mẫu chuẩn đã biết rõ cấu trúc hóa học (vết B). Thực hiện sự giải ly, mỗi bản với một hệ dung môi giải ly khác hẳn nhau. Phải lựa chọn ba hệ dung môi như thế nào để có: một hệ dung môi đẩy các *vết di chuyển gần* với mức xuất phát (hệ dung môi ít phân cực); một hệ dung môi đẩy *vết di chuyển đến khoảng giữa bản* (hệ dung môi phân cực trung bình) và một hệ dung môi đẩy *vết di chuyển xa* với mức xuất phát (hệ dung môi phân cực).

Lưu ý: nên chọn các dung môi khác hẳn, thí dụ hệ (eter dầu hỏa: cloroform) với (benzen: etyl acetat). Không nên dùng cùng một hệ dung môi chỉ thay đổi tỉ lệ, thí dụ (benzen: chloroform 8:2) với (benzen: cloroform 3:7).

Muốn kết luận xem hai hợp chất nào đó có giống nhau hay không, phải đáp ứng cùng lúc hai điều kiện sau, thiếu một cũng không đạt, vì lý do sắc ký lớp mỏng có độ phân giải thấp.

* Về R_f của hai chất so sánh: Cả ***ba*** bản phải có hai vết với R_f luôn giống nhau. Chỉ cần có một bản có sự sai biệt giữa hai vết thì đó là hai chất khác nhau.

* Về màu sắc của hai vết đối với một loại thuốc thử: hai vết phải cho cùng một màu đối với một loại thuốc thử sử dụng. Nếu cho vết có R_f giống nhau mà màu khác nhau, cũng là hai chất khác nhau.

4.3. Để tìm hiểu sơ bộ về tính chất của mẫu chất khảo sát

4.3.1. Biết được số các hợp chất có trong hỗn hợp mẫu ban đầu

Chuẩn bị nhiều bản, chấm mẫu chất lên mỗi bản; mỗi bản giải ly với một hệ dung môi giải ly khác nhau, cần phải dò tìm mới có thể chọn ra được một hệ dung môi phù hợp làm rải các hợp chất ra trên cùng một bản mỏng.

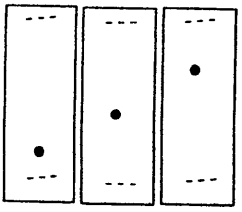
Nhìn số lượng các vết hiện trên bản để đoán biết mẫu ban đầu có chứa bao nhiêu hợp chất. Lưu ý: Do bản mỏng có độ phân giải thấp cho nên nhìn thấy một vết trên bản mỏng không có nghĩa đó là một chất, mà đó có thể là hai hoặc ba chất tụ lại với nhau.

4.3.2. Để kiểm tra độ tinh khiết của một hợp chất

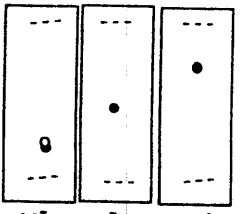
Muốn gửi đo NMR để xác định cấu trúc hóa học của hợp chất, mẫu này phải đạt độ tinh khiết ≥ 95%. Kiểm tra độ tinh khiết của một hợp chất hiệu quả nhất là bằng HPLC, máy sẽ cho biết luôn hàm lượng phần trăm của mẫu chất. Tuy nhiên, thực hiện như thế sẽ khá tốn kém vì HPLC cần có các loại dung môi tinh khiết tiêu chuẩn của HPLC. Có thể tự mình kiểm tra độ tinh khiết của một hợp chất bằng sắc ký lớp mỏng.

Thực hiện gần giống như phần "xem hai hợp chất có giống nhau", nhưng ở đây chỉ thực hiện trên mẫu khảo sát. Chuẩn bị ba bản giống nhau, có vết mẫu. Thực hiện sự giải ly, mỗi bản với một hệ dung môi giải ly khác hẳn nhau. Ba hệ dung môi phải lựa chọn như thế nào để có: một hệ dung môi đẩy các *vết di chuyển gần* với mức xuất phát; một hệ dung môi đẩy *vết di chuyển đến khoảng giữa bản* và một hệ dung môi đẩy *vết di chuyển xa* với mức xuất phát.

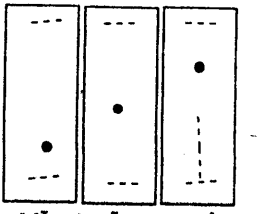
Nếu cả ba bản lúc nào cũng cho thấy vết tròn, gọn là mẫu tinh khiết, còn chỉ cần một bản có thêm các vết khác, là mẫu có lẫn bẩn, cần tinh chế thêm.



Mẫu đã tinh khiết



Mẫu còn lẫn một ít bẩn, cần tinh chế thêm

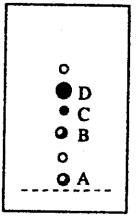


Mẫu còn lẫn một ít bẩn, cần tinh chế thêm

4.3.3. Biết được sơ bộ về thành phần phần trăm của các hợp chất có trong mẫu ban đầu

Khi chọn được hệ dung môi giải ly phù hợp, các vết rải đều ra trên bản mỏng với độ đậm nhạt khác nhau, nhìn độ đậm nhạt có thể đoán biết hợp chất nào nhiều, hợp chất nào ít, đâu là hợp chất đâu là tạp bẩn. Biết được như thế mới có thể đề xuất phương cách xử lý thích hợp nhằm cô lập, tinh chế... các hợp chất có trong hỗn hợp mẫu ban đầu.

Sử dụng sắc ký lớp mỏng để ước đoán thành phần phần trăm các hợp chất có trong mẫu



Mẫu là hỗn hợp có chứa ít nhất là 4 hợp chất chính, với dự đoán sơ bộ

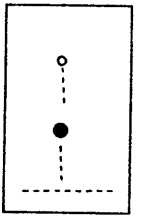
D: # 40%

C: # 10%

B: # 20%

A: # 20%

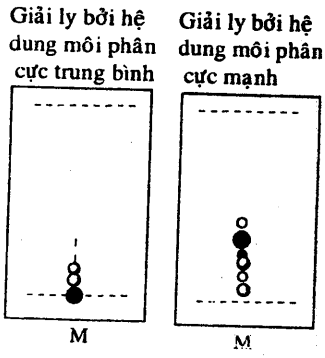
Các tạp bẩn: # 10%



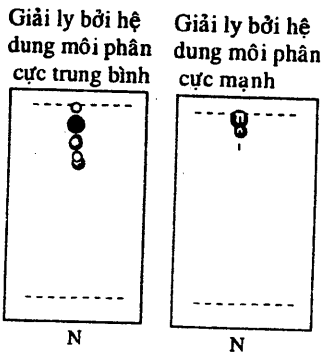
Mẫu có chứa một chất chính, chiếm khoảng 90%, còn lại là tạp bẩn

4.3.4. Biết sơ qua về tính phân cực của những thành phần hợp chất có trong mẫu

Với một mẫu chất, giải ly với nhiều loại hệ dung môi với tính phân cực khác nhau: kém, trung bình, mạnh và quan sát kết quả trên bản mỏng, qua đó đoán biết mẫu chất có chứa những hợp chất có tính chất phân cực như thế nào, để có thể đề xuất phương cách xử lý thích hợp.



(Mẫu M chứa các hợp chất có tính phân cực mạnh)



(Mẫu N chứa các hợp chất có tính ít phân cực)

4.4. Để chuẩn bị cho việc sắc ký cột

4.4.1. Tìm hệ dung môi để bắt đầu cho sắc ký cột

Trước khi triển khai sắc ký cột, nhất thiết phải sử dụng sắc ký lớp mỏng để dò tìm hệ dung môi giải ly cho phù hợp.

* Với hỗn hợp mẫu chất là kết quả của một phản ứng tổng hợp hữu cơ (hỗn hợp chứa 2 - 3 hợp chất), hãy chọn hệ dung môi có thể đẩy ***hợp chất cần quan tâm*** lên ở vị trí trên bản với Rf = 0,2 - 0,3.

* Đối với mẫu cao thô chiết xuất từ cây cỏ (cao có chứa nhiều hợp chất từ không phân cực đến rất phân cực), chọn dung môi giải ly đầu tiên là dung môi có thể đẩy ***vết ít phân cực nhất*** của cao chiết, lên vị trí ở bản với Rf = 0,5 và chọn dung môi chấm dứt sắc ký cột là dung môi có thể đẩy ***vết phân cực nhất*** của cao chiết, lên vị trí ở bản với Rf = 0,2.

Sau khi chọn được hệ dung môi phù hợp, có thể áp dụng hệ dung môi này cho sắc ký cột. Giải ly trước tiên bằng dung môi không phân cực và tăng dần tính phân cực cho dung môi giải ly.

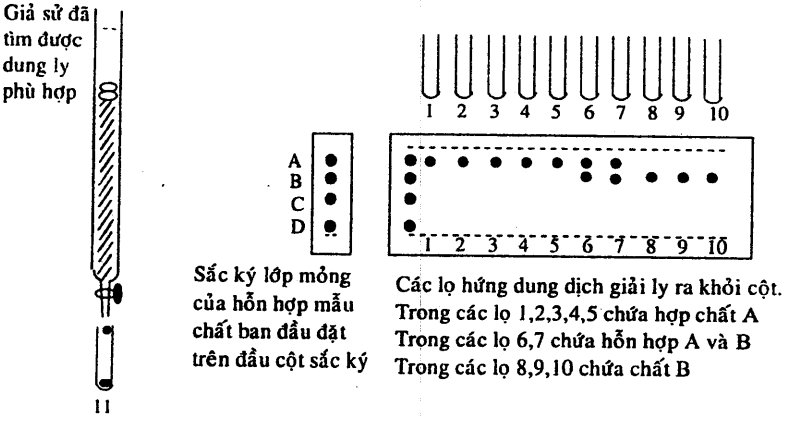
Lưu ý:

* Phải sử dụng pha tĩnh của sắc ký lớp mỏng và của sắc ký cột giống nhau.

* Dung môi để giải ly cột là hệ dung môi đã chọn trong phần thực nghiệm nêu trên, nhưng phải chỉnh tỉ lệ dung môi sao cho có *tính kém phân cực một ít* so với hệ dung môi đã chọn. Bởi vì chất hấp thu, thí dụ silica gel, tráng trên bản mỏng là loại silica gel dùng cho sắc ký lớp mỏng, với cỡ hạt nhuyễn mịn, lại được phun xịt tráng lên bản bằng áp lực lớn nên có độ chặt chẽ lớn. Trong khi đó chất hấp thu do nghiên cứu viên tự nạp cột trong phòng thí nghiệm là loại silica gel dùng cho sắc ký cột, với cỡ hạt lớn hơn, lại được nạp vào cột ở áp suất thường, nên có độ chặt chẽ kém.

4.4.2. Để theo dõi quá trình sắc ký cột

Thí dụ mẫu ban đầu là hỗn hợp có bốn hợp chất A, B, C và D có độ phân cực tăng dần. Nạp mẫu lên đầu cột sắc ký, giải ly với dung môi phù hợp ít phân cực nhất có thể, hứng dung dịch giải ly trong những lọ nhỏ có thể tích nhất định, các lọ được đánh số thứ tự. Theo dõi quá trình sắc ký cột bằng sắc ký lớp mỏng trên mỗi lọ.



Các lọ giải ly từ sắc ký cột được chấm lên trên cùng một bản mỏng. Các vết chấm phải theo thứ tự từ trái qua phải: mẫu hỗn hợp ban đầu, dung dịch trong lọ giải ly số 1, trong lọ số 2, trong lọ số 3,..... số *n*. Giải ly bản mỏng. Hiện hình bản sẽ thấy: vết mẫu hỗn hợp ban đầu có bốn vết; lọ số 1 cho thấy chỉ có vết A; các lọ số 2,3,4,5 cũng chỉ có vết A, nghĩa là cột đang tách chất tốt. Các lọ số 6,7 chứa hỗn hợp hai chất A và B, thu gom để riêng và sau này sẽ sắc ký lại lần nhì. Các lọ 8,9,10 chứa chất B.

Kết quả trên cho thấy cột tách chất tốt đã tách riêng được các chất có trong hỗn hợp ban đầu, tiếp tục thực hiện.

Ghi chú: hệ dung môi giải ly bản mỏng *thường là khác* với hệ dung môi đang giải ly cột, vì hai chất hấp thu, dù cùng là thí dụ silica gel, nhưng có cỡ hạt khác nhau (sắc ký lớp mỏng có hạt nhuyễn mịn hơn), độ chặt chẽ cũng khác nhau.

4.5. Để theo dõi diễn tiến của một phản ứng tổng hợp hữu cơ

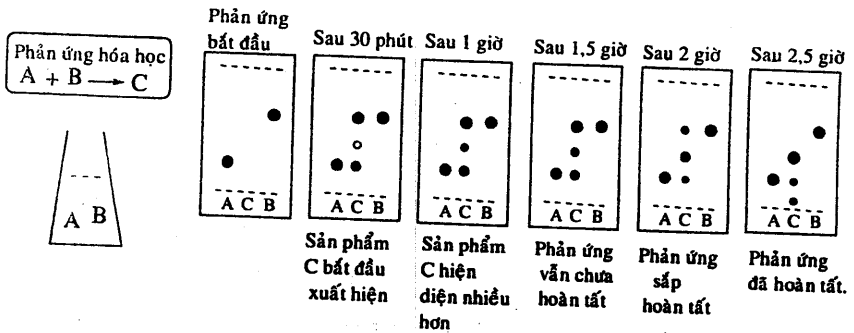
Có phản ứng hóa học A + B cho ra chất C. Sử dụng sắc ký lớp mỏng để theo dõi phản ứng theo thời gian.

Trước khi thực hiện phản ứng, phải chuẩn bị một số việc như sau:

✳ Dò tìm hệ dung môi giải ly bản mỏng sao cho cả ba chất A, B và C cho hiện vết với Rf khác nhau (hoặc ít nhất hai tác chất ban đầu A và B phải có Rf khác nhau).

✳ Chuẩn bị sẵn một số bản mỏng: trên mỗi bản, tại mức xuất phát đều có chấm sẵn hai vết A và B ở hai bên bìa, chừa khoảng chính giữa để sẽ chấm hỗn hợp dung dịch phản ứng.

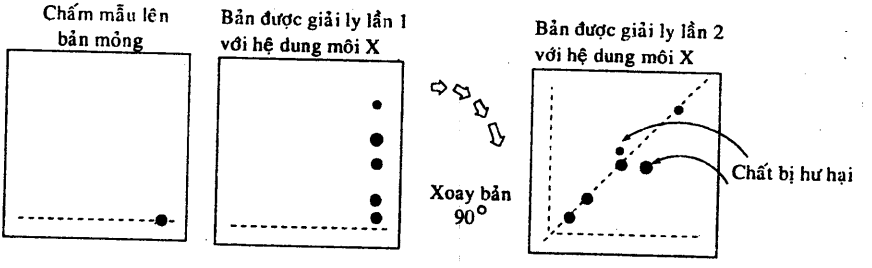
Tiến hành phản ứng. Theo dõi phản ứng theo thời gian bằng cách cứ sau mỗi 30 phút (hoặc một thời hạn nào đó), rút lấy một giọt dung dịch phản ứng để chấm lên bản mỏng, chỗ vết C. Giải ly bản với hệ dung môi đã lựa chọn.



Kết quả cho thấy thời gian đầu chỉ có vết A và B. Theo thời gian: sản phẩm C sẽ xuất hiện, càng lúc càng nhiều, đến một lúc thì một trong hai tác chất ban đầu sẽ biến mất. Ngưng phản ứng và cô lập lấy sản phẩm C bằng sắc ký cột. Hiếm có khi nào sau phản ứng mà có ngay được sản phẩm tinh chất, lúc nào cũng sẽ còn lại tác chất ban đầu hoặc các sản phẩm phụ D, E...

4.6. Để kiểm tra biết một hợp chất có kém bền

Thực hiện giống như phần giải ly bản mỏng hai chiều, trên một bản vuông, nhưng cả hai lần giải ly đều sử dụng hệ dung ly giống nhau. Sau lần giải ly đầu bản được lấy ra, sấy khô và cho trở lại bình sắc ký để giải ly lần nhì.



Hợp chất nào có tính chất không bị thay đổi bởi bất cứ yếu tố nào (ánh sáng, không khí, dung môi...) bắt buộc phải hiện vết trên đường chéo của bản.

4.7. Để cô lập hợp chất (Sắc ký lớp mỏng điều chế)

Ưu điểm của sắc ký lớp mỏng điều chế so với sắc ký cột là: nhanh, dễ tìm được dung môi thích hợp để giải ly tách tốt các chất, các vùng có chứa chất cần thiết sẽ tụ lại thành lớp mỏng dễ dàng phát hiện, dễ dàng cô lập chất. Sở dĩ sắc ký lớp mỏng tách tốt là nhờ tỉ lệ lớn giữa "chất tách: chất hấp thu silica gel" (1:1000 đến 1:10.000) trong khi tỉ lệ này ở sắc ký cột là (1:50 hoặc 1:100).

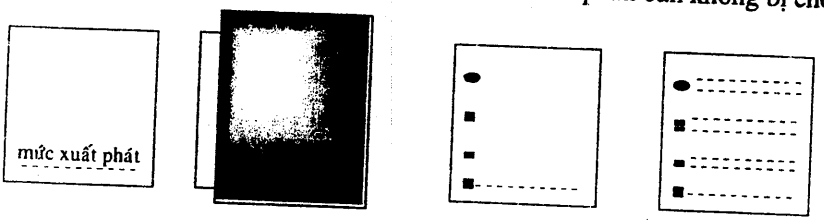
Người ta thường tách chiết cô lập chất bằng sắc ký lớp mỏng điều chế khi hỗn hợp mẫu cần tách có số lượng ít, vài trăm miligam; còn nếu mẫu chất nhiều, vài gam, thì nên tách chất bằng sắc ký cột để đỡ tốn kém.

Nguyên tắc cơ bản của sắc ký điều chế cũng giống như với sắc ký lớp mỏng, chỉ khác nhau ở tấm bản mỏng. Trong đa số trường hợp, sử dụng bản 20 x20 cm, độ dầy lớp hấp thu 1-5 mm. Dung dịch mẫu được chấm *thành một dãy* bởi một vi quản. Sau khi giải ly, trên bản sẽ có nhiều dãy, dùng lưỡi lam hoặc spatule để cạo lớp hấp thu có chứa dãy chất mà người ta cần. Dùng dung môi *thích hợp* để chiết mẫu chất ra khỏi silica gel hoặc alumin.

Nhắc lại, đa số các hợp chất hữu cơ không có màu nên sau khi giải ly, không thể nhìn thấy vết trên bản, phải sử dụng các phương pháp vật lý hoặc hóa học để nhìn thấy các dãy vết.

Để biết được vị trí của vết trên bản mỏng có thể theo các phương pháp như sau:

✳ *Phun xịt bản với thuốc thử đặc trưng*: giúp biết được vị trí của vết mẫu trên tấm bản. Lưu ý: Phần hợp chất trên bản, chỗ tiếp xúc với thuốc thử, đã bị hư hại (tạo phức với thuốc thử), không thể sử dụng để cạo bản, cô lập hợp chất. Để tránh bị hao hụt lượng mẫu chất, dùng tấm kiếng, hoặc tấm nilon để che bớt một phần bản, phun xịt thuốc thử lên phần bản không bị che.



Bản vừa giải ly xong. Do các hợp chất không màu nên không nhìn thấy được các vết

Dùng một tấm kính hoặc tấm nylon che kín phần lớn bản, phun xịt thuốc thử lên phần bản không bị che

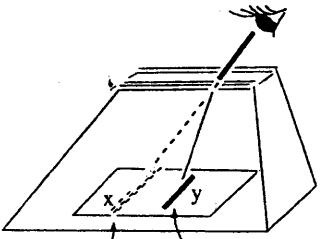
Từ những vết thấy xuất hiện trên bản, suy đoán biết được các dãy vết có trên phần bản còn lại

Dùng spatule cạo lấy phần silica gel trong vùng làm dấu chấm chấm để thu lấy hợp chất

✳ *Soi bản dưới đèn UV*: Cách này có ưu điểm là nhanh, tiện lợi, nhìn được vết mà không bị hao hụt mẫu chất như cách làm trên. Tuy nhiên có nhược điểm là vết có thể ở một vị trí x trên bản, nhưng mắt lại nhìn thấy vết ở vị trí biểu kiến của nó, nghĩa là ở một vị trí khác. Hệ quả là sẽ đánh dấu trật vị trí của vết và không thu được chất gì sau khi cạo bản rồi giải ly. Tùy thuộc vào môi trường không khí ở từng thời điểm, mùa trong năm, mà cũng với

máy soi bản đó có khi gặp trường hợp vết trật vị trí, có khi không gặp. Cần kiểm tra một vài lần bằng cách che một phần bản và phun xịt với thuốc thử, để nhìn rõ vị trí của các vết (cách này bất tiện là một khi đã phun xịt, thuốc thử sẽ tạo phức với chất, biến thành chất khác, phần bản đó không thể sử dụng để cạo bản lấy chất).

Mắt nhìn thấy dãy vết ở vị trí x, ghi dấu và cạo phần bản ở vị trí đó, không thu được chất gì, vì thật sự không có chất ở đó



✳ *Sử dụng hơi iod*: Đặt bản trong một buồng có hơi iod, khi thấy vết hiện lên trên bản, lấy bản ra khỏi buồng, đánh dấu vị trí của vết, phơi bản ngoài gió quạt, hơi iod sẽ bay đi mất. Chờ khi hơi iod bay hết, bản trở nên không màu như cũ, cạo bản để thu chất.

a) Bản tráng sẵn: Các nhà sản xuất có bản tráng sẵn có trộn thêm chất chỉ thị phát huỳnh quang. Sử dụng bản này rất tiện lợi vì chất hấp thu gắn rất chắc lên bản nên khi thao tác không sợ làm tróc bản; bản tráng bằng máy nên rất đồng nhất.

b) Bản tự tráng: Có thể tự tráng bản, tỉ lệ giữa nước cất và chất hấp thu như sau.

Với chất hấp thu là silica gel G

- Độ dầy bản 1,0-1,5 mm: sử dụng tỉ lệ nước: silica gel (1,7 :1,0).
- Độ dầy bản 2,0-4,0 mm: sử dụng tỉ lệ nước: silica gel (1,6 :1,0).
- Độ dầy bản 4,0-5,0 mm: sử dụng tỉ lệ nước: silica gel (1,57 :1,0).

Với chất hấp thu là oxid alumin G

- Độ dầy bản 1,0-1,5 mm: sử dụng tỉ lệ nước: alumina (1,0 : 1,0).

- Độ dầy hơn: sử dụng tỉ lệ nước: alumina (0,9 :1,0).

Sau khi tráng bản xong, để yên ngoài không khí cho khô mặt, hoạt hóa bản bằng cách sấy bản 24 giờ ở 110°C. Bản tự tráng với độ dầy lớn hơn 3mm sẽ dễ gặp trường hợp mặt bản bị nứt.

5. SẮC KÝ LỚP MỎNG CỦA MỘT SỐ HỢP CHẤT HỮU CƠ

5.1. Sắc ký lớp mỏng của amino acid

Sắc ký lớp mỏng có thể được sử dụng để khảo sát các amino acid.

5.1.1. Chất hấp thu

Để tách amino acid có thể là cellulose, alumin, silica gel, polyamid

5.1.2. Một số hệ dung môi giải ly áp dụng cho amino acid

• *Với bản silica gel*, sắc ký lớp mỏng một chiều

96% Etanol : nước (7:3)

n-Propanol : nước (7 :3)

n-Butanol : acid acetic : nước (4: 1: 1)

Phenol : nước (3 : 1)

n-Butanol : acid formic : etanol (3: 1: 1)

n-Butanol : acid acetic : cloroform (3: 1: 1)

Butyl acetat : metanol : acid acetic : pyridin (4: 4: 1: 1)

n-Butanol : acid acetic : etyl acetat : nước (5: 2: 3: 2)

• *Với bản silica gel*, sắc ký lớp mỏng hai chiều

Chiều lần nhất	*Chiều lần nhì*
* *n*-Butanol: acid acetic: nước (4: 1: 5, v/v)	Phenol: nước (15 : 1, w/w)
* Cloroform: metanol: 17% NH_3 (2: 2: 1)	Phenol: nước (3 : 1)
* *n*-Butanol: acid acetic: nước (4: 1: 5)	Cloroform: metanol: 17%NH_3 (2:2:1)
**n*-Butanon: pyridin: nước: AcOH (70:15:15:2)	Cloroform: metanol: 17%NH_3 (2:2:1)

Bảng 8: Kết quả giá trị Rf (x 100) của các amino acid khi sắc ký lớp mỏng trên chất hấp thu pha thường.

Pha tĩnh: (1): Cellulose; (2) và (4): Whatman silica gel; (3): Merck silica gel

Pha động: (1): Butan-2-ol: acid acetic băng: nước (3:1:1).

(2) và (3): *n*-Butanol: acid acetic băng: nước (3:1:1).

(4): *n*-Propanol: nước (7:3)

Amino acid	**(1)**	**(2)**	**(3)**	**(4)**
Acid aspartic	28	27	26	58
Arginin	18	18	17	2
Serin	26	30	27	40
Glycin	26	32	28	43
Tyrosin	46	58	53	78
Alanin	38	32	32	55
Acid glutamic	69	56	50	64
Prolin	45	32	28	50
Cystin	10	11	9	30
Metionin	60	59	51	72
Lysin	15	13	10	4
Tryptophan	55	63	57	82
Valin	60	56	49	68
Threonin	34	32	32	53
Histidin	14	14	11	17
Phenylalanin	68	61	55	80
Leucin	79	61	55	78
Isoleucin	78	59	54	77

5.1.3. Thuốc thử hiện hình amino acid

Có hai loại thuốc thử thông dụng dành cho amino acid

a) Dung dịch 0,2% ninhydrin trong aceton, thêm vài giọt acid acetic. Phun xịt dung dịch lên bản hoặc nhúng bản vào dung dịch thuốc thử, sấy khô ở 60°C trong 20 phút rồi ở 100°C trong 5-10 phút.

Giới hạn của thuốc thử là độ nhạy 1 µg. Đa số các amino acid cho hiện màu tím, acid aspartic cho màu đỏ -xanh dương, prolin và hydroxyprolin cho màu vàng.

b) Ninhydrin (0,3 g), n-butanol (100 ml), acid acetic (3ml). Phun xịt dung dịch lên bản, sấy khô ở 60°C trong 30 phút và ở 110°C trong 10 phút.

5.1.4. Áp dụng

Một số kết quả về khả năng tách riêng các amino acid trên bản mỏng tráng một vài loại chất hấp thu pha thường hoặc pha đảo được trình bày trong các bảng 8 và 9.

Bảng 9: Kết quả giá trị Rf (x 100) của các amino acid khi sắc ký lớp mỏng trên chất hấp thu pha đảo.

Pha tĩnh: (1) và (2): Whatman C-18; (3) và (5): Merck RP-18.
(4) và (6): Merck RP-18W

Pha động: (1), (3) và (4): *n*-Butanol: acid acetic băng: nước (3:1:1)
(2), (5) và (6): *n*-Propanol: nước (7:3).

Amino acid	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
Acid aspartic	30	59	72	60	83	73
Arginin	28	4	35	28	86	82
Serin	55	36	69	50	82	73
Glycin	50	38	62	45	69	54
Tyrosin	91	77	88	68	77	67
Alanin	78	59	71	63	71	54
Acid glutamic	82	70	86	67	83	69
Prolin	56	69	64	40	65	46

Cystin	11	12	39	33	85	84
Metionin	90	74	75	59	75	61
Lysin	31	84	27	24	74	79
Tryptophan	90	77	85	63	72	61
Valin	90	74	75	59	75	61
Threonin	78	52	68	50	72	68
Histidin	21	3	29	23	77	68
Phenylalanin	90	76	83	65	72	61
Leucin	90	77	81	62	75	63
Isoleucin	91	77	81	62	74	61

5.2. Sắc ký lớp mỏng của peptid, protein

Sắc ký lớp mỏng cũng rất tiện dụng trong việc khảo sát các peptid và protein. Một vài thí dụ về việc sử dụng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi, pha tĩnh, thuốc hiện hình... để khảo sát một số protein, peptid được trình bày trong các bảng 10 và 11.

5.2.1. Chuẩn bị tráng bản sắc ký lớp mỏng loại sắc ký gel

* Chuẩn bị bản kiếng (10 x 20 cm): rửa sạch, sấy khô

* Sephadex G-100 hoặc G-200 (6 g) được hòa vào dung dịch 0,5M NaCl (100 ml) (cẩn thận không cho xảy ra sự vón cục). Cần 48 giờ để gel dextran trương nở hoàn toàn. Tráng bản để có một lớp chất hấp thu dầy 0,9 mm. Đặt bản này nằm ngang trong một chậu đậy kín, bên trong chậu có một dĩa chứa sẵn dung môi, để như thế 18 giờ trước khi sử dụng; bản tráng rồi cần phải để trong bình ẩm như thế trong một thời gian dài. Nếu thấy bản bị khô hoặc bị nứt nẻ, dùng dung dịch đệm phun xịt nhẹ một lớp sương lên bề mặt bản.

Bảng 10: Giá trị R_{Hb} của protein khảo sát bằng bản sắc ký lớp mỏng Sephadex.

	Protein	Trọng lượng phân tử	R_{Hb}	
			A	B
1	Cytochrom c	13.000	0,68	0,74
3	Ribonuclease	13.600	0,68	0,74
4	Lysozym	14.500	0,65	0,70
5	Myoglobin	16.900	0,79	0,80
6	α-Chymotrypsin	22.500	0,87	0,87
7	Trypsin	23.800	0,83	0,86
8	Ovomucoid	27.000	0,94	1,03
9	Pepsin	35.000	0,99	1,04
10	Ovalbumin	45.000	1,03	1,04
11	Hemoglobin	68.000	1,00	1,00
12	Bovine serum albumin	65.000	1,28	1,54
13	Bovin γ-glogulin	180.000	1,28	1,54
14	Thyroglobulin	650.000	1,33	1,83
15	Macroglobulin	1.000.000	-	1,86

Ghi chú: $R_{Hb} = d_p / d_{Hb}$ với d_p và d_{Hb} là khoảng đường di chuyển của protein khảo sát so với chuẩn hemoglobin.

A: bản mỏng Sephadex G-100, hệ dung ly: dung dịch 0,5M NaCl.

B: bản mỏng Sephadex G-200, hệ dung ly: dung dịch 0,5M NaCl.

5.2.2. Phát hiện vết protein, peptid

Các bản có thể được quan sát bằng đèn UV (366 nm) hoặc được nhuộm với thuốc thử phù hợp, trình bày trong bảng 11. Một vài loại thuốc thử khác như sau.

a) Tác chất Morin: (Morin là 3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavon)

Bản khô được phun xịt với dung dịch 0,05% morin trong metanol và sấy 2 phút ở 100°C.

Bảng 11: Hệ dung môi, pha tĩnh, thuốc hiện hình của một số protein và peptid.

Ghi chú: Từ (1) đến (9) pha tĩnh là silica gel; (10): pha tĩnh là Sephadex G-100, G-200.

	Protein - peptid	Hệ dung môi giải ly	Thuốc hiện hình
1	Leu-Try-Leu	$CHCl_3$: 34%NH_4OH: etanol (2 : 1 : 2)	Sấy khô 2 giờ ở 60°C, phun với 1% trietylamin trong aceton, rồi 0,1% fluorescamin trong aceton
2	Peptid từ protease	(a): $CHCl_3$: metanol (3:1) (b): $CHCl_3$: metanol: AcOH (45: 4: 1)	(a): 2% Nitroprussiat Na trong nước. (b): 4% Ninhydrin trong aceton: pyridin: AcOH (97:3:2) (c): 1-naptol : NaOBr
3	Insulin	(a): 0,1N HCl: etanol 96% (1:1) (b): 0,5N HCl: etanol: aceton (5 : 3 : 0,5)	0,5% Ninhydrin trong acetone
4	Glycopeptid thu từ *E. coli* và *B. negaterium*	*n*-Butanol: pyridin: acid acetic: nước (130:20:6:24)	Clorin : toluidin
5	Polypeptid có tính base	(a): *n*-Butanol: 25% amoniac: nước (34: 3: 3) (b): cloroform: metanol (9: 1)	Ninhydrin : clorin : toluidin
6	Pepsin, trypsin, α-chymotrypsin	(a): 0,1N HCl: etanol (1:1) (b): 0,5N HCl: etanol: aceton (5: 3 : 0,5)	0,5% Ninhydrin trong aceton, sấy ở 100°C
7	Lipase, diastase, papain, emulsin, invertase	96% etanol: 0,1N HCl (1: 1)	0,5% Ninhydrin trong aceton, sấy ở 100°C trong 10 phút
8	Vasopressin, oxytocin	*n*-Butanol: acid acetic: nước (4 : 1 : 1)	UV
9	Nhiều loại peptid	$CHCl_3$: metanol: 17% amoniac (2 : 2 : 1)	Phun xịt với 0,1% dung dịch 4-cloro-7-nitrobenzofuran trong etanol, tiếp theo là 50% etanol (điều chỉnh về pH 11 bằng NaOH)

10	Bovin serum albumin, cytochrom c, lysozym, α-chymotrypsin, hemoglobin, myoglobin, ovalbumin, pepsin, ribonuclease, trypsin	Kết quả trình bày trong bảng 10	Nhuộm màu trong 0,2% Ponceau S pha trong 10% acid acetic trong nước, tiếp theo là rửa với nước

Các amino acid có đầu *N*- được bảo vệ và các dẫn xuất peptid sẽ cho màu xanh lục-vàng sáng trên nền xanh lục sáng.

b) Tác chất tinh bột: Bản mỏng được đặt trong bầu khí quyển có hơi iod đậm đặc trong 5 phút. Bản được đem ra ngoài không khí để bay bớt lượng iod thừa, kế đó bản được phun xịt với dung dịch nước 1% tinh bột. Các peptid và các amino acid sẽ hiện vết màu xanh dương.

5.2.3. Cô lập, thu hồi các peptid

Sau khi được phát hiện (bằng UV) các vết peptid trên bản silica gel được cạo ra, chuyển vào một pipette Pasteur dài 15 cm. Khoảng ¼ chiều dài của pipette này được nhồi sẵn lớp màng lọc bằng bông thủy tinh, và rửa với 2 ml dung dịch 6N HCl; rồi 200 µl dung dịch 6N HCl có chứa 0,02% chất 2-mercaptoetanol; peptid được chiết tách ở nhiệt độ phòng trong 15 phút.

5.3. Sắc ký lớp mỏng của carbohydrat

Carbohydrat hiện diện rất nhiều trong nhiều loại sinh vật, có công thức tổng quát $C_n(H_2O)_n$ với cấu trúc căn bản là vòng năm (pentose) hoặc vòng sáu (hexose). Carbohydrat có thể là loại monosacarid (một phân tử đường), disacarid (hai phân tử đường), oligosacarid (ít hơn mười phân tử đường) hoặc polysacarid.

Mặc dù monosacarid hiện diện với tỉ lệ cao ở cấu trúc vòng hemiacetal hoặc hemicetal, nhưng chúng có thể chuyển đổi rất nhanh thành loại hợp chất carbonyl mạch hở (dù ở lượng ít, dạng vết). Do carbohydrat có thể hiện diện dưới nhiều dạng khác nhau, chúng lại có nhiều đồng phân và đồng đẳng nên đây là loại hợp chất phức tạp nhất trong các loại hợp chất thiên nhiên.

Sự tách các mono- và oligosacarid đã được thực hiện thường xuyên bằng nhiều phương pháp sắc ký khác nhau: sắc ký lớp mỏng, sắc ký trao đổi ion, sắc ký lỏng trên silica gel, sắc ký khí (qua dẫn xuất), điện di với gel polyacrylamid...

Trong các kỹ thuật trên, sắc ký lớp mỏng có nhiều ưu điểm vượt trội vì thiết bị đơn giản, tương đối nhanh, không cần xử lý mẫu trước, đủ nhạy.

Các carbohydrat thường là các hợp chất có tính acid yếu (pKa 12-14), tính ái nước cao, phân cực mạnh nên cần sắc ký lớp mỏng với pha động là dung môi phân cực mạnh, với thành phần chủ lực là nước; pha tĩnh có hoạt tính hấp thu yếu (bản silica gel, alumin pha thường hoặc có điều chỉnh). Thường là dùng các tấm bản mỏng có bán sẵn, bản có tẩm thêm phosphat, borat, acid boric, bisulfit, molybdat, tungstat, muối kim loại.... Boric và acid boronic có thể tạo phức thuận nghịch được dùng để tách các đồng phân có nhóm chức kề nhau, có thể tạo nối hydrogen.

5.3.1. Chuẩn bị mẫu để phân tích đường

Trong sắc ký trên sacarid, giai đoạn quan trọng là xử lý mẫu vì các mẫu carbohydrat có thể thu từ nhiều nguồn nguyên liệu khác nhau, vì thế cần cô lập và làm đậm đặc dung dịch mẫu đường.

• Nếu mẫu ở dạng dung dịch

- Thường lệ chỉ cần lọc dung dịch ngang qua màng lọc có đường kính lỗ 0,45 – 0,8μm là có thể chấm lên bản mỏng ngay.

- Tuy nhiên nếu mẫu có chứa lượng nhiều các tạp bẩn như muối, ure, protein, chất béo... các chất này có thể làm ảnh hưởng đến quá trình khảo sát nên nhất thiết phải loại bỏ chúng bằng cách lọc ngang qua một cột nhồi polyamid hoặc aminopropyl (lọc như phương pháp chiết pha rắn).

• Nếu mẫu là nguyên liệu từ trái cây tươi

Phân tích các loại đường tự do hiện diện trong trái cây tươi bằng cách chiết phần thịt trái cây tươi bằng metanol hoặc etanol hoặc hỗn hợp metanol-nước. Dung dịch chiết được lọc, cô đặc đuổi alcol. Dung dịch nước đậm đặc

này lại được lọc ngang qua lớp celit hoặc ly tâm. Lớp dung dịch trong suốt sẽ được dùng để chấm lên bản mỏng.

Có thể thực hiện cách khác: phần thịt trái cây được sấy khô ở nhiệt độ cao đến khi mẫu có trọng lượng không đổi. Lấy 1-5 g mẫu khô này, nghiền trong cối với dung dịch nước-etanol (10 ml/g mẫu khô) trong 3-5 phút ở nhiệt độ phòng. Lọc phần dung dịch và ly tâm lấy dung dịch trong. Thực hiện chiết phần bã thêm lần nhì. Dung dịch chiết của hai lần được gộp chung lại, đuổi dung môi cho đến khi có cắn khô. Hoà tan cặn khô này trong một lượng chính xác nước-etanol.

• Nếu mẫu là polysacarid hoặc carbohydrat loại glycosid

Có rất nhiều hợp chất thiên nhiên có gắn thêm phần đường ngang qua nối glycosic. Muốn phân tích phần đường này thì trước nhất phải thủy giải, thường là thủy giải acid. Có nhiều phương pháp thủy giải acid tùy vào cấu trúc của hợp chất cần thủy giải như thành phần các monosacarid, cấu trúc vòng của monosacarid, cấu hình của nối glycosid...

Các nghiên cứu cho thấy cấu trúc đường furanosid linh động, nhạy cảm hơn đường pyranosid; nối α-glycosid nhạy cảm dễ đứt hơn nối β-glycosid, sự hiện diện của các acid uronic, các đường amino làm cho sự thủy giải khó khăn hơn.

Thường thuỷ giải với acid clorhydric, acid sulfuric, acid trifluoroacetic với nồng độ từ 0,5M cho đến vài mol/ lít, ở nhiệt độ cao. Sau khi thủy giải, phần acid vô cơ đã sử dụng cần phải loại bỏ bằng cách cho dung dịch thủy giải đi ngang qua một cột nhựa trao đổi ion hoặc các phương pháp phù hợp khác.

✳ Sau khi thuỷ giải với 1M acid sulfuric, cho thêm vào dung dịch thủy giải một lượng dung dịch carbonat barium để biến phần acid thừa thành sulfat barium trầm hiện và khí carbonic. Lọc bỏ trầm hiện sulfat barium.

✳ Loại bỏ lượng nhỏ HCl 1M bằng cách cô quay dung dịch ở áp suất thấp; loại bỏ lượng lớn bằng cách rửa dung dịch nước thủy giải nhiều lần bằng dung dịch 10% di-*n*-octylmetylamin pha trong cloroform.

5.3.2. Phát hiện carbohydrat trên sắc ký lớp mỏng

• *Phát hiện bằng UV*: Các carbohydrat hấp thu UV rất yếu, muốn quan sát, phải điều chế chúng thành các dẫn xuất thích hợp (Xem thêm ở chương sắc ký khí).

• *Phát hiện bằng nhiệt độ*: Đa số các đường đơn giản (aldose và cetose) cho màu sáng chói rõ khi sấy bản 160°C, trong 10 phút.

Bảng 12: Một số hệ dung ly sắc ký lớp mỏng trên đường hoặc đường mang nhóm amino với bản silica gel.

	Hệ dung ly	Carbohydrat phân tích	Nguồn gốc mẫu	Thuốc thử phát hiện
1	Acetonitril: H_2O (85:15)	Raf, Mel, Lac, Mal, Suc, Gal, Glu, Fru, Xyl, Rha, dRib	Hỗn hợp khảo sát	Analin-diphenylamin-acid phosphoric
2	Acetonitril: alcol *n*-amyl: H_2O (3:1:1)	GalU, GlcU, Gal, Man, Ara, Xyl, Rha	Dịch chiết cây	*N*-(1-naptyl) -etylendiamin,- - diHCl
3	Acetonitril: etyl acetat: *n*-propanol: H_2O (85: 20:50:100)	Maltodextrin, Isomaltodextrin	Thuỷ giải amylopectin	α-Naptol-acid sulfuric
4	*n*-Butanol: AcOH : H_2O (14: 3:2)	Rha	Nước tiểu	4-Hydroxybenzo-- hydrazid
5	*n*-Butanol: AcOH : Et_2O: H_2O (27:18 : 5 : 3)	Lac, Suc, Gal, Fru, Glc	Nước tiểu	Naptoresorcinol
6	*n*-Butanol: AcOH: H_2O (2 : 1 :1)	Oligosacarid, Glc	Nước tiểu	Orcinol-acid sulfuric
7	*n*-Butanol: aceton: H_2O (3 : 3 :1)	Verbascose, stachylose, Raf, Suc	Dịch chiết cây	Anilin-diphenylamin
8	*n*-Butanol: etanol: H_2O (4:3:3)	Oligosacarid	Dịch chiết cây	Orcinol-acid sulfuric
9	*n*-Butanol: 2-propanol: dịch nước 0,5% acid boric (3:5:2)	Raf, Fru, gal, Glc, Suc, Xyl	Hỗn hợp khảo sát	Thymol-acid sulfuric
10	Etyl acetat: pyridin: AcOH: H_2O (75: 15:10:10)	Xyl, MeGlc, Rha	Nước tiểu	Acid 4- -aminobenzoic

11	Etyl acetat: 2-propanol: H_2O (6: 3: 1)	Raf, Suc, Gal, Glc, Fru, Ara, Xyl, Rha	Hỗn hợp khảo sát	Thymol-acid sulfuric
12	Etyl acetat: etanol: AcOH 60%: dịch nước bão hòa acid boric (5:2:1:1)	Fru, Suc, Glc, oligosacarid	Hỗn hợp khảo sát	Thymol-acid sulfuric
13	Dicloroetan: metanol: AcOH: H_2O (50:50:25:10)	Lac, Fru	Chocolat	Acid 4-aminobenzoic
14	$CHCl_3$: AcOH: H_2O (3:6:1)	Mono-, oligosacarid	Hèm rượu, bia	Thymol-acid sulfuric
15	Acetonitril:AcOH: EtOH: H_2O (13:1:2:4)	GlcN, GalN, ManN, acid D-muramic	Thủy giải polysacarid	Ninhydrin, $AgNO_3$
16	Metanol: aceton (5:1)	Glc-HCl, ManN-HCl, GalN-HCl, GlcNAc	Thủy giải polysacarid	Ninhydrin
17	Etyl acetat: pyridin: AcOH: acid propionic: H_2O (50:50:5:5:10)	Ino, SorH, ManH, Ery, mono-, di-, trisacarid	Hỗn hợp khảo sát	2',7'-Diclorofluorescein-tetra-acetat chì
18	Etyl acetat: aceton: AcOH: H_2O (10:10:5:1)	Sor, SorH, manH, mono-di-tri-sacarid Sor	Kiểm tra Sor, SorH, ManH	Tetra-acetat chì
19	2-Pentanol: etyl acetat: H_2O (83:11:6)	Cyclitol (Inositol)	Hỗn hợp khảo sát	$KMnO_4$-NaOH

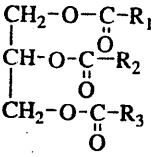
5.3.3. Một số chữ viết tắt của carbohydrat

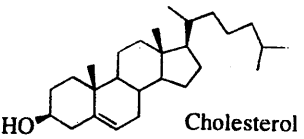
Ara: arabinose; Rib: ribose; Gal: galactose; Glc: glucose; Xyl: xylose; Man: mannose; Fuc: flucose; Fru: fructose; Sor: sorbose; MaGlc: 3-*O*-metylglucose; dGlc: 2-deoxyglucose; dRib: 2-deoxyribose; Suc: sucrose; Mal: maltose; Lac: lactose; Pan: panose; Raf: raffinose; AraH: arabinitol; XylH: xylitol; ManH: mannitol; SorH: sorbitol; Ino: inositol; Ery: erythritol; GalN: galactosamin; GlcN: glucosamin; GlcNAc: *N*-acetylglucosamin; ManNAc: *N*-acetylmanosamin; LacNAc: *N*-acetyllactosamin, GlcU: acid glucuronic; GalU: acid galacturonic.

5.4. Sắc ký lớp mỏng của lipid (Xem thêm chương 2, mục lipid)

• *Sáp:* là hỗn hợp các ester trong đó phần dẫn xuất từ acid carboxylic thường có số carbon chẵn từ 16 đến 36 carbon, còn phần dẫn xuất từ alcol thường có số carbon chẵn từ 24 đến 36 carbon. Thí dụ thành phần chính của sáp ong là triacontyl hexadecanoat.

Glycerid
R_1, R_2, R_3
dây dài từ C11 đến C18

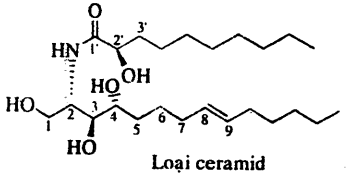




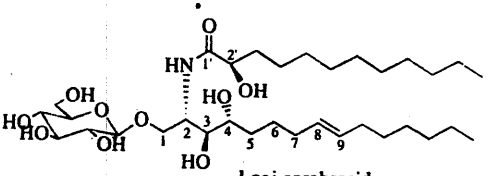
Cholesterol

• *Mỡ và dầu béo*: Mỡ động vật, dạng rắn và dầu béo thực vật, dạng lỏng, là triester của glycerol, được gọi tổng quát là triacylglycerol (hoặc triglycerid).

• *Ceramid và cerebrosid*: là các glycolipid cũng thường gặp trong một số loài thực vật.



Loại ceramid



Loại cerebrosid

Sắc ký lớp mỏng được sử dụng rộng rãi để phân tích chất béo, trong các loại chất hấp thu, silica gel được ưa chuộng nhất. Bản mỏng silica gel có thể được xử lý trước với các tác chất hoá học như borat, ion bạc... để thay đổi tính chất của chất hấp thu. Chất béo cũng có thể cô lập bằng sắc ký điều chế.

Bảng 13 trình bày sự phân tích một số lipid bằng sắc ký lớp mỏng.

Bảng 13: Phân tích một số lipid bằng sắc ký lớp mỏng.

	Hợp chất phân tích	Pha tĩnh	Pha động
1	Caroten, canthaxantin	Whatman KC-18	Metanol: aceton (1:1)
2	Caroten aldehyd	Dầu parafin	Metanol
3	Caroten aldehyd	Whatman KC-18	Eter dầu hỏa: acetonitril: metanol (1:2:2)

4	Ceramid	Silica gel + 2% arsenit natri	Cloroform: metanol (95:5)
5	Ceramid acetat	Si. gel tẩm $AgNO_3$	$CHCl_3$: benzen: aceton (8:2:1)
6	Clorophyl	Whatman KC-18	MeOH: THF: H_2O (75:20:5)
7	Diglyceryl acetat	Si. gel tẩm $AgNO_3$	Cloroform: metanol: H_2O (65:25:4)
8	Acid béo	Silica gel	Hexan: AcOH: H_2O (100:5:2,5)
9	Gangliosid	Silica gel	$CHCl_3$: MeOH: 2,5N NH_4OH (60:40:9)
10	Glycerid	Silica gel tẩm acid boric	Cloroform: aceton (96:4)
11	Glycosphingolipid	Silica gel	$CHCl_3$: MeOH: H_2O (65:25:4)
12	Lipid	Silica gel	Ete dầu hỏa: etyl ete: AcOH (70: 40:2)
13	Lipid	Silica gel	$CHCl_3$: MeOH: H_2O (65:25:4)
14	Phospholipid	Silica gel	$CHCl_3$: MeOH: H_2O (25:10:1)
15	Phospholipid	Silica gel	Aceton: AcOH: H_2O (100: 2:1)
16	Sterol	Silica gel	Hexan: etyl acetat (8:2)
17	Sterol	Si. gel tẩm $AgNO_3$	$CHCl_3$: aceton (95:5)
18	Sterol, steryl acetat	Undecan	AcOH: acetonitril (1:3)
19	Triacylglycerol	Tetradecan	Aceton: acetonitril (8:2)
20	Sáp ester	Silica gel	Hexan: etyl eter (98:2)

5.4.1. Chuẩn bị mẫu lipid để phân tích

Sau khi thu được mẫu lipid từ động vật và thực vật, cần phải phân tích lipid ngay. Nếu không thể tiến hành ngay thì phải trữ mẫu trong tủ lạnh qua đêm ở 4°C còn muốn trữ mẫu lâu hơn nữa phải để trong tủ đông – 20°C hoặc lạnh hơn.

Lipid rất dễ tự oxid hóa, mẫu cần phải thực hiện trong bầu khí quyển nitơ. Không được trữ mẫu ở dạng khô mà nên để trong một lượng nhỏ thể tích dung môi như cloroform, hexan, trong bầu khí quyển nitơ, giữ ở – 20°C.

Mô mỡ động vật thường không có nhiều hợp chất metyl ester vì thế nếu phân tích thấy hợp chất này hiện diện lượng nhiều, nghĩ đây là chất giả tạo (artifact) phát sinh ra trong quá trình thực nghiệm (có sử dụng dung môi metanol?).

• *Nếu lipid là thành phần chính trong hợp chất khảo sát*: có thể chấm mẫu này ngay lên bản mỏng (thí dụ dòng 1 của bảng 14). Các loại mẫu như thế có thể là máu, nước miếng, nước tiểu. Bản mỏng silica gel có mẫu này được triển khai với hệ dung môi giải ly là cloroform: metanol: nước (65:30:5) hai lần, mỗi lần đi một đoạn 3,7 cm và tiếp theo triển khai với

hexan: dietyl eter: acid acetic (80:20:1:5) cho đến khi dung môi đi đến cách đầu bản 1 cm thì ngưng. Bản mỏng được xử lý với NH_4HCO_3, đun nóng 10 phút ở 150°C, sẽ thấy dấu vết sáng chói của lipid.

• *Nếu lipid có tỉ lệ nhỏ trong hợp chất khảo sát*: cần phải chiết, cô lập, làm đậm đặc trước khi chấm lên sắc ký lớp mỏng. Có nhiều qui trình chiết tách, cô lập lipid trình bày trong bảng 14.

Bảng 14: Một vài qui trình chiết tách, cô lập lipid từ các loại mẫu vật khác nhau.

	Mẫu vật	Kỹ thuật chiết tách lipid	Ghi chú
1	Mô; huyết thanh	Chấm trực tiếp lên bản mỏng	Bản được triển khai với dung môi hữu cơ
2	Phẩm vật sinh học	$CHCl_3$: metanol (2 :1). Tỉ lệ mẫu : dung môi (1 : 20)	Kỹ thuật thông dụng chiết tách lipid trung tính; lipid phức tạp
3	Phẩm vật sinh học	$CHCl_3$: metanol: H_2O (1: 2: 0,8). Sau khi chiết, pha loãng mẫu với 1 thể tích $CHCl_3$, một thể tích nước	Kỹ thuật đặc trưng để chiết tách lipid phân cực như gangliosid
4	Máu	$CHCl_3$: isopropanol : H_2O (7: 11:2)	Chiết chất béo nhưng không chiết chất màu của máu
5	Mô não	Trước tiên chiết với 0,25% acid acetic để loại bỏ các chất không lipid; tiếp theo chiết với $CHCl_3$: metanol (2:1)	Chiết bằng $CHCl_3$: metanol thu được chất béo khá sạch
6	Tế bào thực vật	Trước tiên xử lý thực vật với isopropanol rồi chloroform: isopropanol (1:1), rồi mới áp dụng qui trình chiết với $CHCl_3$: metanol (2:1)	Dùng isopropanol để ức chế hoạt động của con men lipase thực vật.
7	Vi khuẩn	Etanol: etyl eter (3:1) Tỉ lệ mẫu vi khuẩn: dung môi (1 :30)	Áp dụng tốt cho dòng vi khuẩn influenza
8	Phẩm vật sinh học	Cho dung dịch mẫu đi ngang qua cột silica gel hoặc Florisil	Giải ly bằng cloroform tách lipid đơn giản khỏi lipid phức tạp
9	Glycolipid	Cho dung dịch mẫu đi ngang qua cột trao đổi ion DEAE	Làm giàu gangliosid và lipid tính acid trước khi sắc ký lớp mỏng
10	Glycolipid phẩm vật sinh học	Cho dung dịch mẫu đi ngang qua cột silica gel H với tetrahydrofuran: metanol: metanal: nước	Glycolipid được giải ly ra khỏi cột trước phospholipid
11	Phẩm vật sinh học	Cho dung dịch mẫu đi ngang qua cột silica gel với cloroform; cloroform: aceton rồi cloroform: metanol	Tách thành các phân đoạn: lipid trung tính, glycolipid và phospholipid

Bảng 15: Các thuốc hiện hình bản mỏng để phát hiện lipid.

	Thuốc thử	Qui trình thực hiện	Kết quả
1	2',7'-Diclorofluoresein	Phun dung dịch 0,2% trong etanol 96%. Quan sát dưới đèn UV	Lipid phân cực bão hòa và bất bão hòa cho vết xanh lục trên nền tím.
2	Coomassie brilliant blue	Phun dung dịch 0,03% trong dung dịch metanol: nước (2:8).	Vết xanh dương trên nền không màu
3	Rhodamin B	Phun dung dịch 0,05% trong alcol.	Vết tím trên nền hồng.
4	Acid phosphomolybdic	Phun dung dịch 5% trong etanol. Sấy bản 100°C trong 5-10 phút.	Vết xanh dương-đen trên nền vàng
5	Clorur antimon ($SbCl_3$)	Phun dung dịch 10% trong cloroform. Sấy bản 110°C trong 1-2 phút.	Vết có màu khác nhau trên nền không màu.
6	Iod	Phun dung dịch 1% trong alcol. Hoặc đặt vài tinh thể iod trong hộp kín	Vết nâu đậm trên nền vàng nhạt.
7	Dicromat kali-Acid sulfuric	Phun dung dịch 5% $K_2Cr_2O_7$ trong dung dịch nước acid sulfuric 40%. Sấy bản 120-180°C trong 15-40 phút.	Vết có màu đen trên nền không màu.
8	Acid sulfuric	Phun dung dịch nước 50% H_2SO_4. Sấy bản 120-180°C trong 15-40 phút.	Vết có màu đen trên nền không màu.
9	Acetat đồng - Acid phosphoric	Hoà 3 g acetat đồng trong 100 ml dung dịch nước 8% H_3PO_4. Sấy bản 130-180°C trong 30 phút.	Vết có màu đen trên nền không màu.
10	Acid sulfuric-metanol	Phun dung dịch 50% H_2SO_4 trong metanol. Sấy bản 100°C trong 5 phút.	Vết có màu nâu-đen trên nền không màu.

5.4.2. Các loại pha tĩnh sắc ký lớp mỏng cho lipid

Có thể sử dụng bản tráng sẵn hoặc tự làm lấy. Dù với loại nào, cần thử nghiệm để tìm ra được thông số tối ưu cho loại lipid cụ thể đang muốn khảo sát. Các kết quả nghiên cứu cho thấy có thể tách riêng các loại lipid khác nhau như sau:

* Bản silica gel tẩm 1 -5% $AgNO_3$ có thể tách các hợp acid (*Z*)-alcenoic ra khỏi hỗn hợp gồm nhiều hợp chất béo bất bão hòa.

* Bản silica gel tẩm borat có thể tách riêng được hai loại hợp chất mang hai nhóm –OH kề nhau (*vic*-diol) có cấu hình *cis-cis* và *cis-trans*.

* Bản silica gel tẩm borat có thể tách riêng được hai loại hợp chất glucocerebrosid và galactocerebrosid.

✳ Bản silica gel tẩm etylendiamintetraacetat (EDTA) ở tỉ lệ 0,09% w/w có thể tách riêng phospholipid có tính acid cách xa các lipid khác.

✳ Bản silica gel tẩm amonium sulfat có thể tách phosphatidylserin và phosphatidylinositol.

Bảng 16: Một vài qui trình đặc trưng để phát hiện một số loại lipid.

	Loại lipid	Thuốc thử	Qui trình thực hiện	Kết quả
1	Cholesterol. Cholesteryl acetat	$FeCl_3$	Dung dịch xịt bản mỏng: 50mg $FeCl_3$- $6H_2O$, 90 ml H_2O, 5ml CH_3COOH, 5 ml H_2SO_4. Sấy bản ở 100°C trong 2-3 phút	Hiện vết đỏ-tím; cholesterol hiện trước ester
2	Acid béo tự do	2',7'-Diclorofluoresein, $FeCl_3$, $AlCl_3$	Pha ba dung dịch sau: 0,1% 2',7'--diclorofluoresein trong metanol 95%; 1% $AlCl_3$ trong etanol; 1% $FeCl_3$ trong nước. Lần lượt phun xịt bản với mỗi loại thuốc thử, sau mỗi lần phun, sấy bản khô.	Acid béo tự do hiện vết màu hồng
3	Phospholipid	Thuốc thử Dragendorff: KI và bismuth subnitrat	Pha hai dung dịch: 40% KI trong nước; 1,7% bismuth subnitrat trong acid acetic 20%. Trộn 5 ml dung dịch nhất với 20 ml dung dịch nhì và thêm 75 ml nước. Phun xịt bản và sấy ở 100°C trong 2-3 phút	Phospholipidhiện vết màu cam-đỏ
4	Phospholipid	Ninhydrin	Pha 0,2% ninhydrin trong butanol và thêm 3 ml acid acetic. Phun xịt bản và sấy ở 100°C trong 2-3 phút	Phospholipidhiện vết màu đỏ-tím
5	Glycolipid (Cerebrosid, sulfatid, gangliosid)	α-Naptol-acid sulfuric	Pha hai dung dịch: 0,5% α-Naptol trong 100 ml dung dịch metanol:acid sulfuric (1:1). Dung dịch H_2SO_4 95%. Phun dung dịch nhất, để khô tự nhiên rồi phun dung dịch nhì. Sấy ở 120°C đến khi hiện màu rõ	Cerebrosid, sulfatid, gangliosid và các glycolipid khác hiện vết màu vàng
6	Glycolipid	Orcinol-acid sulfuric	Hoà 20 mg orcinol trong 100 ml H_2SO_4 75%. Phun xịt bản và sấy ở 150°C trong 15 phút	Glycolipid hiện vết màu xanh dương-tím trên nền trắng
7	Sphingolipid (ceramid, cerebrosid, gangliosid, sulfatid)	Hypoclorit natri-Thuốc thử benzidin	Dung dịch (1): 5 ml hypoclorit natri, 50 ml benzen, 5 ml acid acetic. - Hoà 0,5 g benzidin, 1 tinh thể KI vào 50 ml etanol 50%. Phun (1), sấy khô rồi phun (2)	Sphingolipid hiện vết xanh dương trên nền trắng.

8	Gangliosid	Resorcinol	Pha 2% dung dịch nước resorcinol. Lấy 10 ml này, thêm 80 ml HCl có chứa 10,5 ml 0,1M $CuSO_4$. Phun bản và sấy ở 110°C trong vài phút	Gangliosid hiện vết xanh dương-tím, còn glycolipid hiện vết vàng.

5.4.3. Các hệ dung môi giải ly sắc ký lớp mỏng các loại lipid khác nhau

a) Các lipid trung tính: glycerid, sterol, ester steryl, acid béo tự do, các lipid trung tính...

- Hệ dung môi: hexan: dietyl eter: acid acetic (80:20:1) hoặc (70:30:1). Thêm acid acetic để giúp tránh hiện tượng kéo đuôi trên bản mỏng.

-Thí dụ áp dụng: Có thể tách glycerid và acid béo tự do ra xa khỏi sterol tự do bằng sắc ký lớp mỏng hai lần: Lần đầu với isopropyl eter: acid acetic (96:4). Bản được sấy khô và giải ly lần thứ nhì *cùng chiều với lần đầu*, nhưng với hệ dung ly là eter dầu hỏa: dietyl eter: acid acetic (90:10:1).

b) Các phospholipid: Thường sử dụng sắc ký hai chiều để tách hỗn hợp phức tạp phopholipid trong tế bào động vật, thực vật. Dung môi triển khai lần nhất: cloroform: metanol: nước (65:25:4). Dung môi triển khai lần nhì có thể là *n*-butanol: acid acetic: nước (60:20:20) hoặc cloroform: aceton: metanol: acid acetic: nước (5:2:1:1:0,5).

Mặc dù sắc ký hai chiều giúp làm tách các hợp chất phospholipid xa nhau rõ hơn nhưng các vết thường lan rộng và vệt bị kéo dài.

c) Các glycolipid: Thường rất khó tách rời hoàn toàn bằng sắc ký lớp mỏng một chiều vì thế nên sử dụng sắc ký hai chiều. Chiều đầu tiên với hệ dung ly cloroform:metanol:7N hydroxid ammonium (65:30:4). Bản mỏng được sấy khô và xoay bản 90°C rồi giải ly cho chiều thứ nhì với hệ dung ly cloroform:metanol:acid acetic:nước (170:25:25:6).

Có tác giả cũng đề nghị hệ dung ly khác: Chiều đầu tiên với hệ dung ly cloroform:metanol:nước (56:25:4). Bản mỏng được sấy khô và xoay bản 90°C rồi giải ly cho chiều thứ nhì với hệ dung ly tetrahydrofuran:metylal: metanol:nước (10:6:4:1).

5.4.4. Các thuốc hiện hình bản mỏng để phát hiện lipid

Có nhiều loại thuốc thử để phát hiện lipid, có loại thuốc thử vạn năng, có loại đặc trưng; có thể phun xịt thuốc thử lên bản hoặc nhúng bản vào dung dịch thuốc thử.

Một số thuốc thử để phát hiện lipid được trình bày trong bảng 15 và 16.

5.5. Sắc ký lớp mỏng của flavonoid (Xem thêm chương 2, mục flavonoid)

5.5.1. Các aglycon flavonoid

Sắc lý lớp mỏng rất hữu dụng đối với tất cả các loại flavonoid. Các aglycon của flavonol và flavon dễ dàng tách xa nhau. Có thể sắc ký điều chế các flavanon với hệ dung môi toluen: etyl acetat: acid acetic (80:19:1). Có thể sắc ký điều chế các flavonol aglycon với hệ dung môi benzen: buta-2-on: metanol.

Bảng 17 trình bày một số hệ dung môi phù hợp để sắc ký lớp mỏng các aglycon flavonoid khác nhau.

Dưới ánh sáng thường, các flavonoid không có màu hoặc có màu vàng, rất khó quan sát sự hiện diện của chúng. Thuốc thử Naturstoffreagenz A có thể giúp quan sát rõ, cũng như phân biệt một số loại flavon và flavonol khác nhau.

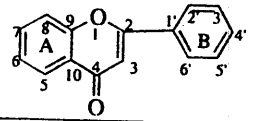
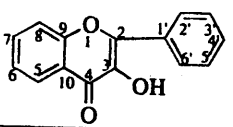
Thuốc thử Naturstoffreagenz A: pha 1% hỗn hợp diphenyl: acid boric: etanolamin trong metanol. Phun xịt bản, sấy khô rồi phun dung dịch polyetylenglycol 4000 (viết tắt là PEG 4000). Sấy bản khô và quan sát dưới đèn UV_{366}, các flavon và flavonol hiện màu sắc khác nhau. Kết quả màu của một số flavonoid với thuốc thử Naturstoffreagenz A/PEG 4000 được trình bày trong bảng 18.

Bảng 17: Một số hệ dung ly phù hợp cho aglycon flavonoid.

Loại flavonoid	Pha tĩnh	Hệ dung ly	Phát hiện
Auron	Cellulose	Butanol: AcOH: H_2O (4:1: 5)	VIS
Chalcon	Cellulose	Butanol: AcOH: H_2O (4:1: 5)	VIS
Dihydrochalcon	Cellulose	H_2O	UV

Flavanon	Cellulose	AcOH: H_2O (5:95)	UV
Isoflavon	Silica gel	$CHCl_3$: MeOH (89:11)	UV
Biflavonoid	Silica gel	Toluen: HCOOEt: HCOOH (5: 4: 1)	UV
Flavon-flavonol			
aglycon	Silica gel	Toluen: HCOOEt: HCOOH (5: 4: 1)	UV
aglycon	Polyamid	Toluen: Metyl etyl ceton: MeOH (60: 25 :15)	UV
aglycon	RP-18	MeOH: HCOOH: H_2O (58: 10 :16)	UV
glycosid	Cellulose	Butanol: AcOH: H_2O (4:1:5)	UV
glycosid	Silica gel	Etyl acetate:acid formic: acid acetic: H_2O (100:11:11:27)	UV

Bảng 18: Giá trị R_f của aglycon flavonoid trên sắc ký lớp mỏng với các loại pha tĩnh khác nhau. Màu sắc của vết khi bản được phun xịt bằng thuốc thử Naturstoffreagenz rồi quan sát dưới đèn UV_{366}.

Flavon   Flavonol

Loại flavonoid	Vị trí nhóm thế		Hệ thống				Màu của vết
	OH	OCH_3	(1)	(2)	(3)	(4)	
Flavon							
Flavon			0,50	0,60	0,86	0,29	Xanh dương
5-Hydroxyflavon	5		0,63	0,74	0,88	0,22	Nâu
6-Hydroxyflavon	6		0,31	0,50	0,65	0,39	Xám
7-Hydroxyflavon	7		0,29	0,48	0,51	0,41	Xanh dương
7,8-Dihydroxyflavon	7,8		0,22	0,43	0,32	0,57	Xám-nâu
Chrysin	5,7		0,48	0,57	0,52	0,33	Lục-nâu
Apigenin	5,7,4'		0,29	0,46	0,18	0,48	Xanh lục
Acacetin	5,7	4'	0,42	0,54	0,45	0,30	Xám-lục
Apigenin-7,4'-dimetyl eter	5	7,4'	0,56	0,66	0,86	0,14	Xám-lục
Luteolin	5,7,3',4'		0,22	0,38	*0,06*	0,53	Vàng

Diosmetin	5,7,3'	4'	0,23	0,43	0,41	0,46	Xám
Tangeretin		5,6,7,8,4'	0,25	0,48	0,89	0,26	Xám
Flavonol							
Galangin	3,5,7		0,51	0,59	0,41	0,38	Xanh lục
Kaempferol	3,5,7,4'		0,32	0,48	0,14	0,57	Vàng-lục
Kaempferid	3,5,7	4'	0,48	0,59	0,38	0,37	Dương-lục
Kaempferol-7,4'-dimetyl eter	3,5	7,4'	0,63	0,73	0,74	0,18	Dương-lục
Kaempferol-3,4'-dimetyl eter	5,7	3,4'	0,43	0,55	0,61	0,35	Lục olive
Kaempferol-3,7,4'-trimetyl eter	5	3,7,4'	0,61	0,69	0,87	0,19	Xanh lục
Quercetin	3,5,7,3',4'		0,23	0,41	0,06	0,67	Vàng-nâu
Tamarixetin	3,5,7,3'	4'	0,31	0,48	0,19	0,53	Xanh lục
Rhamnetin	3,5,3',4'	7	0,29	0,48	0,24	0,45	Cam
Quercetin-3,7-dimetyl eter	5,3',4'	3,7	0,27	0,46	0,47	0,46	Cam
Morin	3,5,7, 2',4'		0,17	0,29	0,02	0,73	Xanh lục
Fisetin	3,7, 3',4'		0,21	0,36	0,08	0,70	Cam
Robinetin	3,7, 3',4',5'		0,08	0,22	0,01	0,82	Cam
Myricetin	3,5,7, 3',4',5'		0,13	0,32	0,02	0,76	Cam-nâu
Quercetagetin	3,5,6, 7,3',4'		00	0,00	0,01	0,95	Nâu-đỏ

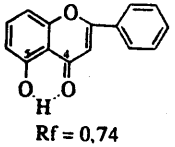
Ghi chú cho bảng 18:

Hệ thống (1) và (2): Pha tĩnh là bản tráng silica gel 60 F_{254}, dầy 0,25mm. Dung môi cho hệ thống (1) là benzen: etyl acetat: acid formic (8:2:1). Dung môi cho hệ thống (2) là toluen: etyl format: acid formic (5:4:1).

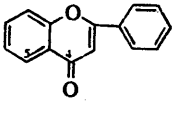
* Cả hai hệ thống đều tách tốt các flavonoid khảo sát, tuy nhiên với hệ dung môi (1), silica gel giữ các flavonoid mạnh hơn so với hệ dung môi (2).

* Các nhóm $-OCH_3$ làm giảm tính phân cực của hợp chất.

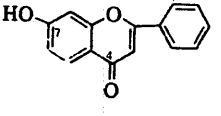
* Nối hydrogen nội phân tử tạo ra giữa nhóm –OH tại C_5 với nhóm C=O tại C_4 làm giảm tính phân cực của flavon; thêm nhóm –OH tại các vị trí khác sẽ làm tăng tính phân cực. Thí dụ 5-hydroxyflavon, flavon và 7-hydroxyflavon có giá trị R_f lần lượt là 0,74; 0,60 và 0,48 trong hệ thống (2).



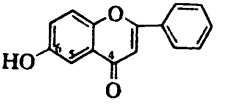
Rf = 0,74



Rf = 0,60



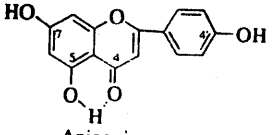
Rf = 0,48



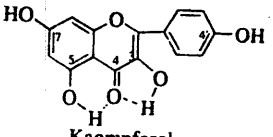
Rf = 0,50

Pha tĩnh: Silica gel; pha động: Benzen: etyl acetat: acid formic (8:2:1)

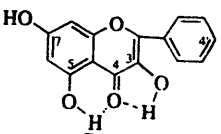
* Các flavonol có nhóm -OH tại C_3 cũng có thể tạo nối hydrogen nội phân tử với nhóm C=O tại C_4, nên flavonol có tính phân cực kém hơn các flavon mang số nhóm thế tương ứng.



Apigenin
Rf = 0,29



Kaempferol
Rf = 0,32



Galangin
Rf = 0,51

Pha tĩnh: Silica gel. Pha động: Benzen: etyl acetat: acid formic (8:2:1)

Hệ thống (3): Pha tĩnh là bản tráng polyamid (DC-Alufolien F_{254}), dầy 0,15mm. Hệ dung môi là: toluen: buta-2-on: metanol (10:5:3).

Hệ thống (4): Pha tĩnh là bản tráng silica gel pha đảo dây C-18 (C-18 F_{254}), dầy 0,25mm. Hệ dung môi là: metanol: acid formic: nước (58:10:16). Kết quả cho thấy kết quả ngược lại với silica gel pha thường. Hợp chất càng phân cực cho vết với R_f càng lớn. Thay thế nhóm –OH bằng $-OCH_3$ không làm thay đổi nhiều tính phân cực đối với pha tĩnh.

5.5.2. Các glycosid flavonoid

Các glycosid flavon và flavonol có thể tách bằng sắc ký lớp mỏng điều chế với pha động là etyl acetat: acid formic: acid acetic: nước (100:11:11:27).

* Các monoglycosid kém phân cực so với các diglycosid.

* Các loại đường cũng có tính phân cực khác nhau: arabinofuranosid > rhamnosid > arabinopyranosid > glucosid > galactosid.

Bảng 19 trình bày một số hệ dung môi phù hợp để sắc ký lớp mỏng các glycosid flavonoid khác nhau.

Bảng 19: Giá trị R_f của glycosid flavonoid trên sắc ký lớp mỏng silica gel với hệ giải ly etyl acetat: acid formic: acid acetic: nước (100:11:11:27).

	Glycosid flavonoid	Tên thông thường	OH	OCH_3	R_f
1	***Flavon***				
2	Apigenin-8-*C*-glu	Vitexin	5,7,4'		0,56
3	Apigenin-6-*C*-glu-7-*O*-glu	Saporanin	5,7,4'		0,20
4	Apigenin-7-*O*-glu	-	5,7,4'		0,57
5	Apigenin-7-*O*-apiosylglu	Apiin	5,7,4'		0,39
6	Luteolin-7-*O*-glu		5,7, 3', 4'		0,54
7	Diosmetin-7-*O*-rhaglu	Diosmin	5,7, 3'	4'	0,31
8	***Flavonol***				
9	Kaempferol-3-*O*-rha		3,5,7, 4'		0,72
10	Kaempferol-3-*O*-glu	Astragalin	3,5,7, 4'		0,65
11	Kaempferol-3-*O*-gal		3,5,7, 4'		0,59
12	Quercetin-3-*O*-ara(f)		3,5,7,3',4'		0,72
13	Quercetin-3-*O*-rha	Quercetin	3,5,7,3',4'		0,69
14	Quercetin-3-*O*-ara(p)		3,5,7,3',4'		0,61
15	Quercetin-3-*O*-glu	Isoquercitrin	3,5,7,3',4'		0,53
16	Quercetin-3-*O*-gal	Hyperosid	3,5,7,3',4'		0,51
17	Quercetin-3-*O*-rut	Rutin	3,5,7,3',4'		0,30
18	Isorhamnetin-3-*O*-glu		3,5,7,4'	3'	0,58
19	Isorhamnetin-3-*O*-rut	Narcissin		3,5,7,4',3'	0,36
20	Tamarixetin-7-*O*-rut		3,5,7,3'	4'	0,34
21	Myricetin-3-*O*-rha		3,5,7,3',4',5'		0,58
22	Myricetin-3-*O*-glu		3,5,7,3',4',5'		0,46
23	Myricetin-3-*O*-gal		3,5,7,3',4',5'		0,45

Ghi chú: glu: glucosid; rut: rutinosid; gal: galactosid; rha: rhamnosid; ara(f): arabinofuranosid; ara(p): arabinopyranosid.

5.6. Sắc ký lớp mỏng của carotenoid

Carotenoid là các tetraterpenoid có màu từ vàng đến đỏ, hiện diện hầu hết trong các loài thực vật. Các carotenoid thường hiện diện ở dạng ester; ở dạng phức gắn chặt chẽ hoặc lỏng lẻo vào lipid hoặc protein.

✳ Cô lập carotenoid kém phân cực từ mẫu tươi bằng cách nghiền trong cối với metanol: aceton (2:1), lọc. Dịch lọc được trích nhiều lần với aceton hoặc hỗn hợp aceton: eter dầu hỏa để chiết cho đến khi hết màu.

* Cô lập carotenoid glycosid bằng metanol, đuổi dung môi ở áp suất kém thu được cao. Cao được hòa thêm một ít nước và chiết lỏng-lỏng với etyl eter. Lớp etyl eter được rửa với dung dịch NaCl 10% và rồi với nước cất, làm khan, đuổi dung môi thu được cao. Cần trữ cao ở trong bầu khí nitơ và ở nhiệt độ thấp (-30°C).

Các xantophyl có trong trái cây, cánh hoa thường hiện diện ở dạng ester với các acid béo mạch dài, cần phải được xà phòng hóa.

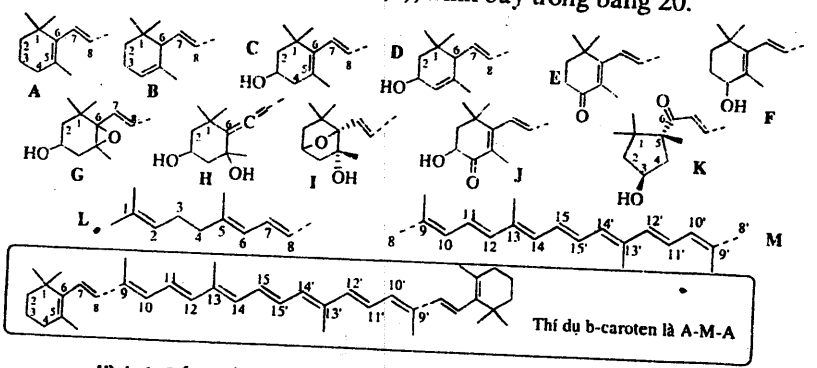
5.6.1. Sử dụng bản mỏng silica gel

Các carotenoid có thể tách riêng nhau ra khi sắc ký lớp mỏng silica gel với hệ dung môi là một dung môi phân cực hòa vào eter dầu hỏa theo các tỉ lệ khác nhau. β-Caroten luôn luôn di chuyển sát với mức tiền tuyến dung môi trong bất kỳ hệ dung ly nào. Các carotenoid luôn có màu vàng đến màu cam. Có thể phun xịt bản với dung dịch $AgNO_3$ cho màu để có thể phân biệt giữa các carotenoid.

Giá trị Rf của các carotenoid trên sắc ký lớp mỏng được trình bày trong bảng 20. Cấu trúc và tên gọi của một số carotenoid là sự phối hợp của các mảnh trình bày trong hình 1, bảng 20.

5.6.2. Sử dụng bản mỏng silica gel pha đảo

Hệ dung ly phù hợp với silica gel pha đảo cho carorenoid là hỗn hợp ba loại dung môi: eter dầu hỏa: acetonitril: metanol với một số tỉ lệ thay đổi như (1:4:5) hoặc (2:4:4) hoặc (2,5 :2,5: 5,0), trình bày trong bảng 20.



Hình 1: Cấu trúc một vài carotenoid sử dụng để minh hoạ cho bảng 20

Bảng 20: Giá trị R_f (x100) của các loại carotenoid trên bản silica gel, Merck; dung môi giải ly phần trăm v/v dung môi phân cực (ghi trên bảng) pha vào eter dầu hỏa (loại 40-60°C).

Carotenoid	Cấu trúc	(%) Aceton			(%) *t*-Butanol			(A)	(B)	(C)
		40	20	10	40	20	10			
β-Caroten	A-M-A	100	100	100	100	100	100	10	13	16
Lycopen	L-M-L	100	97	87	100	100	100	17	23	25
β-Cryptoxanthin	A-M-C	72	34	11	90	78	51	22	31	37
Canthaxanthin	E-M-E	71	36	-	82	69	43	32	51	55
Gazaniaxanthin	C-M-L	70	33	-	90	79	51	26	38	43
Cucurbitaxanthin A	I-M-C	66	11	-	80	59	26	-	-	-
Cucurbitaxanthin B	I-M-G	44	7	-	75	49	18	-	-	-
Lutein	C-M-D	44	7	-	80	56	23	37	55	59
Zeaxanthin	C-M-C	44	7	-	80	55	22	-	-	-
Taraxanthin	D-M-G	41	-	-	73	43	16	47	62	64
Antheraxanthin	C-M-G	40	-	-	70	40	12	44	60	63
Capsanthin	C-M-K	39	-	-	69	38	11	48	64	66
Violaxanthin	G-M-G	33	-	-	62	30	-	55	68	68
Capsorubin	K-M-K	30	-	-	60	24	-	-	-	-
Neoxanthin	H-M-G	18	-	-	48	13	-	63	72	74

Ghi chú: (A), (B), (C) với pha tĩnh: silica gel RP-18; pha động: eter dầu hỏa: acetonitril: metanol với một số tỉ lệ thay đổi lần lượt (1:4:5); (2:4:4) và (2,5:2,5:5).

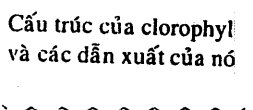
Bảng 21: Giá trị R_f của clorophyl và các dẫn xuất của nó trong sắc ký lớp mỏng.

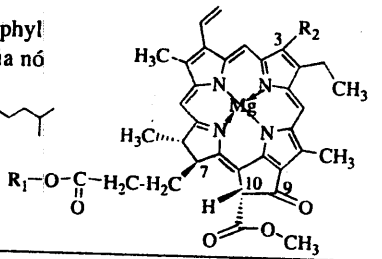
Hệ thống (1): Pha tĩnh là sucrose, lớp 0,4mm: eter dầu hỏa: propan-2-ol (99: 1).

Hệ thống (2): Pha tĩnh là cellulose, lớp 0,1mm: eter dầu hỏa: aceton (8: 2).

Hệ thống (3): Pha tĩnh là silica gel, lớp 0,25mm: dietyl eter: aceton: isooctan (2:2:6)

Cấu trúc của clorophyl và các dẫn xuất của nó





Chất màu	Cấu trúc hóa học				Hệ thống		
	R_1	R_2	Mg		(1)	(2)	(3)
Pyropheophytin a	phytyl	CH_3	–	2H tại C_{10}	0,90	–	–
Pheophytin a	phytyl	CH_3	–		0,84	0,93	0,40
Pheophytin b	phytyl	CH=O	–		0,72	0,88	0,33
Clorophyl a	phytyl	CH_3	+		0,56	0,76	0,27
Clorophyl b	phytyl	CH=O	+		0,30	0,57	0,22
Pheophorbid a	H	CH_3	–		0,05	0,36	-
Pheophorbid b	H	CH=O	–		0,02	0,18	-

5.7. Sắc ký lớp mỏng của clorophyl

Clorophyl, chất màu đại phân tử - đa vòng, tetrapyrol, ở trạng thái tự nhiên, phân tử có chứa một ion magne, là hợp chất tạo nên màu xanh lá cây cho thực vật. Clorophyl hiện diện trong tất cả các loài thực vật, trong một số loại tảo và cả ở một vài loại vi khuẩn.

Clorophyl là hợp chất rất nhạy cảm. Khi tiếp xúc với ánh sáng, nhiệt độ, acid, base, một vài loại dung môi, vài loại chất hấp thu... clorophyl thay đổi cấu trúc hoá học.

Chiết tách clorophyl: Nghiền trong cối 50 g mẫu cây với aceton, lặp lại sự chiết như thế vài lần. Gộp các dung dịch aceton, lọc; chiết lỏng-lỏng với eter dầu hỏa. Đuổi dung môi ở áp suất thấp, thêm vào dung dịch 10% NaCl và chiết lỏng-lỏng với dietyl eter. Dung dịch này được làm khan nước và đuổi dung môi thu được cao có chứa clorophyl. Trữ clorophyl trong một ít aceton hoặc dietyl eter, trong bầu khí quyển nitơ, ở nhiệt độ 4°C.

Tinh chế clorophyl ở dạng phức clorophyl-dioxan: Dung dịch đậm đặc nói trên được tận chiết với 2-propanol. Cho thêm dioxan vào dung dịch propanol này theo tỉ lệ: dung dịch: dioxan (1:7), để yên trong tủ lạnh sau hai giờ sẽ thấy tủa là phức clorophyl-dioxan. Ly tâm thu lấy tủa. Lặp lại quá trình

tạo phức như thế vài lần sẽ thu được phức tinh sạch không có lẫn carotenoid và lipid. Phức này được hòa tan trong dietyl eter hoặc aceton trước khi đem đi phân tích.

Giá trị R_f của clorophyl và các dẫn xuất của nó trong sắc ký lớp mỏng với các pha tĩnh khác nhau được trình bày trong bảng 21.

5.8. Sắc ký lớp mỏng của quinon

Quinon hiện diện trong hầu hết các loài thực vật, trong khắp các bộ phận của cây, tuy nhiên thường ở rễ, vỏ cây, lõi cây. Quinon có màu từ vàng đến đỏ, tím cho đến đen nhạt.

Trong thực vật, các quinon hiện diện nhiều ở dạng 1,4-naptoquinon và 9,10-antraquinon. Các antraquinon thường mang thêm các nhóm metyl, metoxy, hydroxy, *O*-glycosid và *C*-glycosid. Cũng có thấy dạng khử, dimer hoặc gắn thêm dây dài.

5.8.1. Sắc ký lớp mỏng silica gel các naptoquinon

• Muốn chiết naptoquinon: 50 g mẫu cây tươi (thí dụ cây *Drosera rotundifolia*) được nghiền trong cối với 100 ml dietyl eter có thêm 1% H_2SO_4 đậm đặc và để yên 8 giờ. Lọc, đuổi dung môi, rồi thêm 50 ml dung dịch 2M H_2SO_4 và thực hiện sự lôi cuốn hơi nước, dung dịch chưng cất màu vàng được chiết với dietyl eter.

• Hệ dung môi giải ly:

Với naptoquinon kém phân cực: eter dầu hỏa: etyl acetat (6: 3)

hoặc toluen: etyl acetat (15: 1)

Với naptoquinon phân cực: hexan: aceton: acid acetic (75: 25: 1,5)

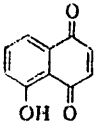
• Phun xịt bản với thuốc thử: dung dịch 10% KOH trong methanol. Các naptoquinon chuyển thành màu xanh dương-tím.

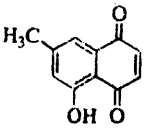
Bảng 22: Giá trị R_f một vài antraquinon trên sắc kỹ lớp mỏng.

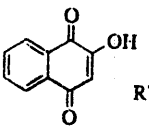
Hệ thống (1): Silica gel 60 F_{254}; eter dầu hỏa: etyl acetat: acid formic (75:25:1)

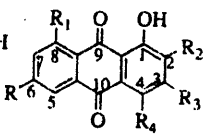
Hệ thống (2): Silica gel 60 F_{254}; cloroform: etyl acetat: dioxan: hexan: acid acetic (10,6: 9,9: 9,0: 70,6: 0,5)

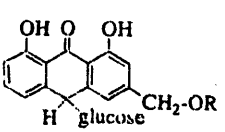
Hệ thống (3): Silica gel 60 N-HR/UV_{254}; eter dầu hỏa: etyl format: acid formic (75:25:5)


Juglon


7-Metyljuglon


Lawson


Antraquinon


Aloin (R=H);
Aloinosid (R=rhamnosid)

Antraquinon	Nhóm thế					Hệ thống		
	R	R_1	R_2	R_3	R_4	(1)	(2)	(3)
Chrysophanol	H	OH	H	CH_3	H	0,65	0,49	0,66
Physcion	OCH_3	OH	H	CH_3	H	0,59	0,44	0,56
Emodin	OH	OH	H	CH_3	H	0,36	0,18	0,30
Alizarin	H	H	OH	H	H	0,25	0,25	0,32
Purpurin	H	H	OH	H	OH	0,20	0,17	0,34
Rhein	H	OH	H	COOH	H	0,15	0.04	0,22
Aloe-emodin	H	OH	H	CH_2OH	H	0,13	0,12	0,15

Bảng 23: Giá trị R_f một vài antraquinon glycosid trên sắc ký lớp mỏng silica gel 60 F_{254} (0,25 mm, Merck); etyl acetat: metanol: nước (100: 13,5: 10).

Antraquinon glycosid	Tên thông thường	R_f
Emodin-6-*O*-apiosid	Frangulin B	0,59
Emodin-6-*O*-rhamnosid	Frangulin A	0,50
Emodin-8-*O*-glucosid		0,41
Chrysophanol-8-*O*-glucosid		0,41
Physcion-8-*O*-glucosid		0,41
Aloe-emodin-8-*O*-glucosid		0,36
Emodin-6-*O*-apiosyl-8-*O*-glucosid	Glucofrangulin B	0,23
Aloin -11-*O*-rhamnosid		0,19
Emodin-6-*O*-rhamnosyl-8-*O*-glucosid	Glucofrangulin A	0,17
Rhein-8-*O*-glucosid		0,15

5.8.2. Sắc ký lớp mỏng silica gel các antraquinon

Giá trị R_f một vài antraquinon và antraquinon glycosid trên sắc ký lớp mỏng với một số hệ dung môi khác nhau được trình bày trong bảng 22 và 23.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. **A. Braithwaite, F.J. Smith**. *Chromatographic methods. Kluwer Academic Publishers*. Boston-London, 45-501, 1999.

[2]. **Joseph Sherma, Bernard Fried**. *Handbook of thin-layer chromatography*. Marcel Dekker, Inc. New York, Hong Kong, 1996.

[3]. **MM. M. Bitzer, U. Claus, H. Felber, B. Vollenweider**. *Labo. Le guide pratique CIBA du laboratoire de chimie*. Livre Total Lausanne et Polytechnica Paris. 1990

[4]. **Richard J.P. Cannell**. *Natural Products Isolation*. Humana Press, Totowa- New Jersey, 20-212, 1998.

CÁC PHƯƠNG PHÁP CÔ LẬP HỢP CHẤT HỮU CƠ

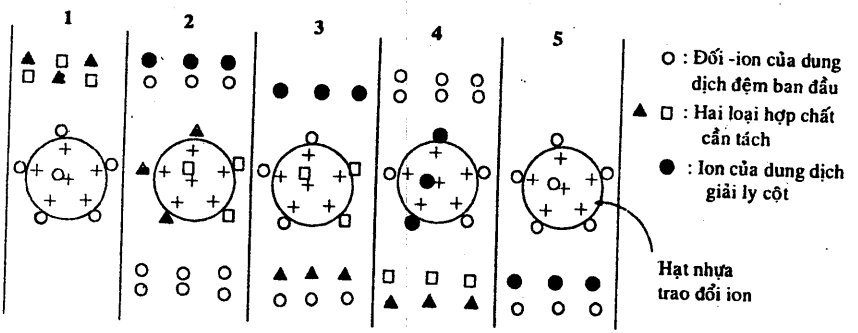
Chương 5

SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION

Sắc ký trao đổi ion là một trong những phương pháp để cô lập hợp chất hữu cơ. Kỹ thuật này được biết đến từ năm 1930 và đến năm 1940 mới có báo cáo cho biết sử dụng để cô lập và tách các amino acid từ dung dịch thủy giải protein. Cho đến nay kỹ thuật này vẫn còn được sử dụng rộng rãi để phân tích và cô lập các protein.

Trong sắc ký trao đổi ion, yếu tố chính liên quan đến việc lưu giữ và tách riêng các hợp chất dựa vào *sự tương tác tĩnh điện* (electrostatic attraction) *giữa các hợp chất* có mang điện tích hiện diện trong mẫu phân tích *với các tâm có mang điện tích ngược dấu* (với điện tích của hợp chất) của pha tĩnh.

Trong việc cô lập các hợp chất tự nhiên, với hỗn hợp mẫu chất ban đầu có chứa nhiều loại hợp chất khác nhau, nếu trong số đó có loại hợp chất có mang điện tích, sử dụng kỹ thuật sắc ký trao đổi ion để tách hợp chất đó ra khỏi hỗn hợp.



Hình 1: Các giai đoạn trong quá trình trao đổi ion

Giai đoạn 1: Nhựa trao đổi ion đang cân bằng với các đối- ion của nó. Các hợp chất cần phân tích sẵn sàng đi ngang qua nhựa.

Giai đoạn 2: Nhựa trao đổi ion đang trao đổi với các hợp chất cần phân tích, các đối-ion của nhựa bị loại ra khỏi nhựa. Sau giai đoạn cân bằng này, việc giải ly sẽ được thực hiện.

Giai đoạn 3: Ion của dung dịch giải ly đang tranh dành trao đổi với nhựa để đẩy tách hợp chất (▲) ra khỏi nhựa.

Giai đoạn 4: Gia tăng nồng độ của dung dịch giải ly, để ion của dung dịch giải ly đủ mạnh để tranh dành trao đổi với nhựa để đẩy tách hợp chất (■) ra khỏi nhựa

Giai đoạn 5: Tái tạo nhựa, trả lại tình trạng nhựa ban đầu.

1. CÁC KIẾN THỨC CĂN BẢN VỀ SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION

1.1. Các đặc điểm tổng quát của nhựa trao đổi ion

Nhựa trao đổi ion là những hạt hình cầu, không tan trong nước; trên bề mặt hạt nhựa mang những nhóm chức có mang điện tích dương hoặc âm (các nhóm này được gọi là nhóm hoạt động của nhựa); các nhóm chức này luôn luôn kiên kết với đối-ion của nó.

Nếu nhựa mang nhóm chức có điện tích dương, đối-ion của nó có điện tích âm. Nhựa này thực hiện sự trao đổi với các ion âm nên được gọi là ***nhựa trao đổi anion***. Ngược lại, nhựa mang nhóm chức có điện tích âm thì đối-ion của nó có điện tích dương, nhựa này thực hiện sự trao đổi với các ion dương nên được gọi là ***nhựa trao đổi cation.***

Nhựa trao đổi anion mang những nhóm chức hoạt động là các amin tam cấp -NR_2 hoặc ammonium tứ cấp $-N^+R_3$. Nhựa thường được sản xuất với đối-ion là clorur (Cl^-). Nhựa trao đổi cation mang những nhóm chức hoạt động là các acid, thường là $-SO_3H$, $-PO_3H$, $-COOH$... Nhựa thường được sản xuất với đối-ion là natri (Na^+ hoặc H^+).

Mỗi loại nhựa trao đổi đều có loại trao đổi mạnh và yếu. Loại *nhựa trao đổi ion tính base mạnh* sẽ hấp thu - bắt giữ tất cả các hợp chất nào có tính acid; trong khi đó, loại *nhựa trao đổi ion tính base yếu* sẽ chỉ hấp thu - bắt giữ

hợp chất nào có tính acid mạnh và không bắt giữ hợp chất có tính acid yếu. Tương tự, loại *nhựa trao đổi ion tính acid mạnh* sẽ hấp thu - bắt giữ tất cả các hợp chất nào có tính base; và loại *nhựa trao đổi ion tính acid yếu* sẽ chỉ hấp thu - bắt giữ hợp chất nào có tính base mạnh và không bắt giữ được hợp chất có tính base yếu.

Các loại nhựa loại mạnh được sử dụng thường hơn vì nhựa có thể hoạt động trong một khoảng rộng pH. Các loại nhựa acid yếu và base yếu chỉ hiện diện ở dạng ion khi nó ở dạng muối, vì thế khoảng pH hoạt động có giới hạn.

Sự trao đổi ion có thể thực hiện trong cột sắc ký hoặc trong becher. Không có sự khác biệt về kết quả khi thực hành theo một trong hai kỹ thuật này, chỉ cần chú ý ở giai đoạn cân bằng, gắn hợp chất vào hạt nhựa.

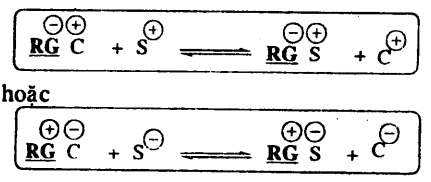
Một số đặc trưng của các loại nhựa được trình bày trong bảng 1 và 2 (ở cuối chương).

Bảng 1: Một số đặc trưng của các loại nhựa trao đổi ion.

Tên nhựa trao đổi ion	Tính acid base	Nhóm hoạt động	Khoảng pH hiệu quả	Khả năng trao đổi (trên resin khô)
Nhựa SP	Acid mạnh	Sulfoxyl ($-SO_3H$)	1 - 14	4 mmol H^+/ g
Nhựa CM	Acid yếu	Carboxymetyl ($-CH_2-COOH$)	5 - 14	9 -10 mmol H^+/ g
Nhựa QAE (*Q*uaternary *a*mino *e*tyl)	Base mạnh	(2-Hydroxypropyl)--dietyletylamonium ($-CH_2-CH_2-N^+R'R_2$)	1 - 15	4 mmol OH^-/ g
Nhựa DEAE	Base yếu	Dietylaminoetyl ($-CH_2-CH_2-NR_2$)	1 - 9	4 mmol OH^-/ g

1.2. Lý thuyết về sự trao đổi ion

Lý thuyết của sự trao đổi ion là sự gắn kết có tính chất thuận nghịch giữa các phân tử có mang điện tích, như minh hoạ sau.



R: pha tĩnh, còn được gọi là nhựa (resin)
G: nhóm chức mang điện tích được cố định trên pha tĩnh. Còn được gọi là nhóm chức hoạt động của nhựa
C: đối-ion của G
S: chất hữu cơ có mang điện tích trái dấu với G

Trong sắc ký với cột nhồi pha tĩnh R có gắn thêm nhóm chức (G) mang điện tích. Giả sử cho đi ngang qua cột một hỗn hợp mẫu chất ban đầu có chứa nhiều loại chất tan (solute) khác nhau, chất tan nào có mang điện tích ngược dấu với điện tích của nhóm chức, thí dụ chất tan (S), chất tan sẽ đuổi đối-ion (C) ra, thế chỗ vào, để được gắn vào pha tĩnh, và như thế chất tan bị giữ lại trong cột, trong khi đó những loại chất khác của hỗn hợp mẫu chất ban đầu sẽ không bị giữ lại, nên đi ra khỏi cột. Kỹ thuật này đã tách riêng được hợp chất S ra khỏi hỗn hợp ban đầu.

Trong thực nghiệm, các nhà sản xuất có pha tĩnh với nhóm chức G mang điện tích dương hoặc mang điện tích âm. Biết rằng bất kỳ một loại ion âm hoặc ion dương nào đó đều phải có đối-ion (counter-ion) của nó đi kèm, không bao giờ có một ion âm (hoặc dương) hiện diện riêng rẽ một mình.

Quá trình gắn kết giữa các phân tử mang điện tích trái dấu là quá trình có tính chất thuận nghịch, cho phép tái tạo lại được chất trao đổi ion ban đầu, để có thể sử dụng lại nhiều lần.

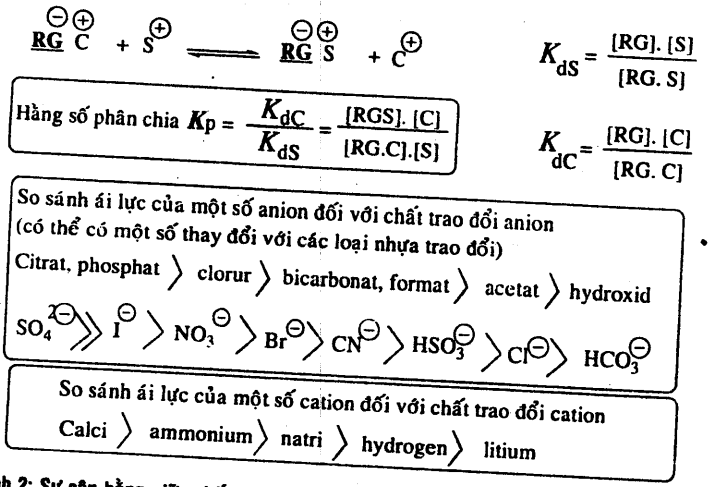
Điện tích của hợp chất hữu cơ có thể điều chỉnh bằng cách chỉnh pH của dung dịch. Các acid hữu cơ sẽ mang điện tích âm ($R\text{-}COO^-$) khi pH của dung dịch lớn hơn pKa của hợp chất acid; các amin mang điện tích dương ($R\text{-}NH_4^+$) khi pH của dung dịch nhỏ hơn pKa của hợp chất amin.

Thí dụ tại pH> 6,0, đa số các acid carboxylic hiện diện ở dạng điện tích âm ($R\text{-}COO^-$) và như thế chúng bị giữ lại trong cột trao đổi ion mang nhóm chức hiện diện ở điện tích dương, thí dụ các nhóm ammonium. Tương tự, các amin được proton hóa tại pH< 8,0 vì tại điểm đó amin mang điện tích dương ($R\text{-}NH_4^+$) và như thế chúng bị giữ lại trong cột trao đổi ion mang nhóm chức hiện diện ở điện tích âm, dù ở cùng pH, thí dụ như nhóm chức acid sulfonic hoặc acid carboxylic (pH > 6,0).

Muốn một hợp chất tan được giữ lại trong cột sắc ký trao đổi ion, chất tan đó phải đuổi được đối-ion, đang hiện diện bên cạnh nhóm chức có mang điện tích cố định vào pha tĩnh. Phản ứng cân bằng trình bày trong hình 2 lệ thuộc vào hằng số phân chia Kp. Hằng số phân chia Kp là tỉ số giữa hai hằng số phân ly K_{dC} và K_{dS}. Biết rằng K_{dC} và K_{dS} lần lượt là hằng số mà đối-ion C hoặc chất tan S có thể gắn dính vào nhóm chức hoạt động của nhựa.

Sự thành công hoặc thất bại của quá trình thực nghiệm trao đổi ion tùy thuộc vào ái lực tương đối (relative affinity) của nhóm chức hoạt động của nhựa đối với các ion khác nhau, cũng như nồng độ của các ion đó.

Nói chung, đối với *một nhóm chức* hoạt động của nhựa: các ion đa điện tích (polyvalent ions) do có nhiều vị trí có thể tương tác nên chúng có ái lực mạnh hơn các ion đơn điện tích. Các ion có tính khả phân cao (polarizable) hoặc có trạng thái oxid hóa cao sẽ có ái lực mạnh trong quá trình trao đổi ion. Yếu tố này dựa vào lực tương tác Coulomb.



Hình 2: Sự cân bằng giữa chất tan S và đối-ion C tùy thuộc vào hằng số phân chia Kp

Ái lực tương đối như trình bày nêu trên giúp giải thích vì sao ion clorur (ái lực mạnh) rất hiệu quả trong việc đuổi ion carboxylat (ái lực thấp) ra khỏi cột nhựa trao đổi anion. Tương tự, ion natri không cho hiệu quả cao trong việc đuổi các amin mang điện tích dương vì ion natri có ái lực thua ion ammonium.

Quá trình thực nghiệm trao đổi ion còn lệ thuộc vào nhiều yếu tố khác, thí dụ như sự tương tác giữa các phân tử của mẫu chất ban đầu (các phân tử có kích thước lớn, nhỏ khác nhau) cũng như các vùng không bị ion hóa trên bề mặt của nhựa trao đổi. Với một thể tích nhất định của nhựa trao đổi, sẽ chứa một số lượng cố định các nhóm chức hoạt động. Điều này có thể ước tính bằng cách đo khả năng của nhựa trao đổi.

Mỗi một loại nhựa đều được nhà sản xuất xác định rõ khả năng trao đổi ion của nó. Thí dụ một loại nhựa có khả năng 3 miliđương lượng cho mỗi gam (3 millliequivalents per gram), viết tắt là 3 meq/g, nghĩa là về mặt lý thuyết mỗi gam nhựa này có khả năng bắt giữ được 3 milimol loại phân tử mang đơn điện tích hoặc bắt giữ được 1 milimol loại phân tử mang ba điện tích.

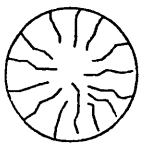
Hình 1 ở trang đầu tiên mô tả các giai đoạn xảy ra trong quá trình thực hiện sắc ký trao đổi ion. Trước tiên, người ta tìm cách gắn các hợp chất cần phân tích có mang điện tích, thí dụ hai loại chất ▲ và □, vào nhựa trao đổi ion. Tiếp theo, người ta tìm cách lần lượt tách rời từng hợp chất ra khỏi nhựa. Sự tách rời xảy ra vì các hợp chất khảo sát có đặc điểm điện tích khác nhau, nên chúng được tách rời khỏi nhựa tùy theo điều kiện thực nghiệm, như làm tăng nồng độ muối hoặc thay đổi độ pH của dung dịch giải ly...

1.3. Các nguyên liệu sử dụng làm nhựa trao đổi ion

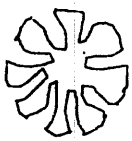
Các nguyên liệu được sử dụng làm nhựa trao đổi ion là những hạt không tan trong nước, bề mặt của hạt mang những nhóm chức có điện tích dương hoặc âm. Mỗi điện tích dương (hoặc âm) luôn có đối-ion hiện diện kề bên. Nguyên liệu làm nhựa trao đổi ion có thể là các loại polysacarid hoặc resin tổng hợp. Có ba loại nguyên liệu chính: nhựa polystyren, các polymer carbohydrat và silica gel.

Các nguyên liệu được chọn phải đáp ứng một số đặc điểm như: dung môi giải ly có thể chảy ngang qua nhựa với một vận tốc thoả đáng, hạt nhựa có độ bền cơ học. Các nhà sản xuất cung cấp nhiều loại nhựa có hoặc không có lỗ rỗng. Các hạt nhựa có lỗ rỗng là loại nhựa do các đại phân tử nối mạng ngang, tạo thành các lỗ rỗng rắn chắc trong cấu trúc của hạt nhựa.

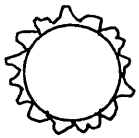
Khi thực nghiệm với hạt nhựa loại gel có lỗ rỗng, cần phải ngâm hạt nhựa trong dung môi, để hạt nhựa có thời gian trương nở, phơi bày tất cả các nhóm chức hoạt động đang có trên bề mặt của nó. Với các hạt nhựa làm bằng nguyên liệu không có lỗ rỗng thí dụ như silica gel, có nhiều ưu điểm về vận tốc giải ly nên thời gian tách chất có thể nhanh gấp năm lần loại nhựa làm bằng nguyên liệu có lỗ rỗng.



Gel có lỗ rỗng
(Porous gel)



Resin đại phân tử tạo mạng
(Macroreticular resin)



Silica tạo nối
(Bonded-phase silica)

Đường kính của hạt nhựa loại polymer thường được tính bằng mesh, trong khi hạt nhựa làm bằng silica thường được tính bằng micron. Hạt nhựa loại polymer thường được sử dụng là 100-200 mesh. Các hạt nhựa lớn (50-100 mesh) thường được sử dụng cho cột để tách chất; còn hạt nhựa nhỏ (200-400 mesh) cũng như hạt silica (5-10 μm) phù hợp để phân tích định tính.

1.3.1. Nhựa polystyren

Nguyên liệu dùng làm nhựa trao đổi ion thông dụng nhất thường là polystyren, metacrylat có tính kỵ nước, mang nhiều nhóm chức hoạt động. Hạt nhựa rắn chắc, có độ bền cơ học, chịu được nhiệt độ và điều kiện pH khác nhau của môi trường. Các nhựa polystyren chịu được điều kiện pH 1,0 - 14,0; còn nhựa metacrylat chịu được pH 2,0 -10,0.

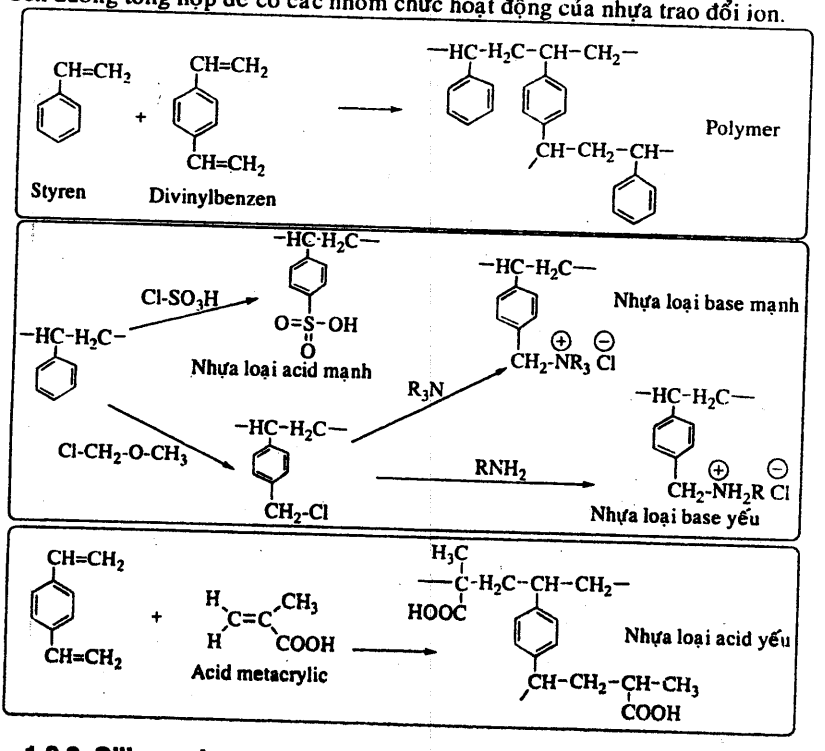
Resin loại polystyren kỵ nước (hydrophobic) thông dụng nhất là Dowex, được tổng hợp từ những chuỗi styren và các chuỗi dây này được nối mạng ngang nhờ divinylbenzen (viết tắt là DVB). Thay đổi lượng DVB trong phản ứng tạo mạng ngang dẫn đến thành lập các loại hạt nhựa có độ tạo mạng ngang khác nhau. Chỉ số X-2, X-4, X-8 biểu diễn phần trăm DVB đã sử dụng là 2, 4, 8%; trong các loại nhựa này, nhựa 8% là thông dụng.

Khả năng và tính chọn lọc của các loại hạt nhựa gia tăng theo độ tạo mạng ngang, theo đó các nhóm chức hoạt động có nhiều hơn, bù lại sự trương

nở khó khăn hơn. Hơn nữa, nhựa có độ tạo mạng ngang cao sẽ có thời gian cân bằng chậm.

Nhược điểm lớn nhất của loại nhựa kỵ nước polystyren là có sự tương tác xảy ra giữa các chất tan cần tách và chất nền (giá mang các nhóm hoạt động) của pha tĩnh, khiến cho sau quá trình sắc ký, không thể đuổi hết các chất tan ra khỏi cột nhựa, gây khó khăn trong quá trình tái tạo hạt nhựa.

Con đường tổng hợp để có các nhóm chức hoạt động của nhựa trao đổi ion.



1.3.2. Silica gel

Gần đây có loại silica gel chế hóa bằng cách cho các nhóm chức silanol của silica tác dụng với nhiều loại clorur silil khác nhau để tạo thành những loại chất hấp thu mới, với các đặc tính vật lý đổi khác, được gọi là silica gel-tạo nối (bonded silica gel). Loại silica gel này không trương nở trong dung môi.

Hạt nhựa loại này có nhược điểm là phải có pH ổn định, cần thực nghiệm trong khoảng pH 2,0 -7,5, còn nếu phải thực nghiệm ở điều kiện pH ngoài khoảng giá trị nêu trên, hạt nhựa chỉ bền trong một thời gian ngắn.

Các hạt nhựa loại này có kích cỡ nhỏ (5-50 μm) nên thời gian cân bằng nhanh, có thể chịu được pH cao (nếu chỉ xảy ra trong một khoảng thời gian ngắn), phù hợp cho sắc ký HPLC.

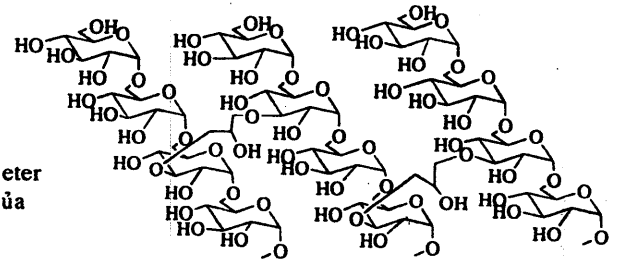
1.3.3. Polymer carbohydrat

Đầu tiên, loại hạt nhựa này được chế tạo từ các polysacarid để tách các hợp chất đại phân tử sinh học thí dụ các protein. Loại hạt nhựa này có tính chất ái nước (hydrophilic) nên không làm biến tính protein.

Loại nhựa carbohydrat gồm có nhựa Sepharose (là agarose tạo mạng ngang) và cellulose, nhưng thông dụng nhất là nhựa Sephadex của hãng Pharmacia, là loại dextran được nối mạng ngang.

Do tính chất ái nước của nhựa, nên ít xảy ra sự tương tác giữa các chất tan cần tách và mạng ngang của pha tĩnh như trường hợp nhựa polystyren.

Các nhóm chức hoạt động được gắn lên các đơn vị đường của nhựa Sephadex thông qua các nối eter. Ghép thêm nhóm chức dietylaminoetyl (DEAE) là pha tĩnh trong sắc ký trao đổi anion; ghép thêm nhóm chức carboxymetyl (CM) là pha tĩnh trong sắc ký trao đổi cation.



Cấu trúc hóa học của gel Sephadex. *Các nhóm chức hoạt động* được gắn vào mạng thông qua nối eter của các nhóm -OH của đường glucose.

Hạt nhựa dextran có dạng hình cầu, đường kính hạt 40-120 μm. Nhựa dễ dàng trương nở trong nước nên dễ nạp vào cột và cho dòng chảy của dung môi giải ly khá dễ.

Nhựa Sephadex không tan trong bất kỳ dung môi nào. Nhựa bền trong nước, trong các dung dịch nước muối, trong dung môi hữu cơ, trong những dung dịch có tính acid yếu hoặc base yếu. Dung dịch có tính acid mạnh có thể gây ra sự thủy giải chuỗi dây glucose.

Khi thực nghiệm, cần tránh điều kiện pH < 2, tránh nhiệt độ cao, tránh những sản phẩm có tính oxid hóa. Tuy nhiên, trong quá trình tái tạo nhựa, có thể để nhựa tiếp xúc với dung dịch NaOH 0,1M hoặc HCl 0,2 M trong một khoảng thời gian ngắn mà không sợ nhựa bị thủy giải.

Nhựa được bán dưới dạng bột khô, nên muốn thực hiện quá trình trao đổi ion, điều đầu tiên là làm trương nở nhựa.

Tổng lực mạnh lý thuyết của nhựa là số lượng các nhóm mang điện tích có trong 1 gam nhựa khô, được nhà sản xuất ghi trên nhãn của hộp đựng. *Lực thực sự* của nhựa là số lượng các nhóm mang điện tích, có được trong thực tế, ở điều kiện thực nghiệm đang tiến hành. Lực này tuỳ vào lực ion của từng loại nhựa, nồng độ dung dịch giải ly, lực của đối ion. Độ pH, nhiệt độ của dung dịch giải ly cũng có vai trò quan trọng nhất là khi sử dụng loại nhựa trao đổi yếu. Lực mạnh của nhựa trao đổi ion Sephadex của một số loại nhựa thương mại được trình bày ở bảng 4.

Có hai loại nhựa Sephadex 25 và Sephadex 50. Các con số 25 hoặc 50 liên quan đến độ rỗng trên hạt nhựa (Bảng 6). Các lỗ rỗng của nhựa Sephadex không ảnh hưởng lên cơ chế của nhựa gắn lên hợp chất cần khảo sát nhưng độ rỗng của nhựa có ảnh hưởng đến các nhóm chức hoạt động ở vị trí bên trong hạt nhựa; các nhóm chức ở vị trí này không thể tiếp xúc với các phân tử khảo sát có trọng lượng phân tử lớn.

Cần lưu ý là không có hiện tượng sắc ký lọc gel trong trường hợp sắc ký trao đổi ion, do đặc điểm của hai loại hạt nhựa khác nhau.

Nhựa Sephadex 25 có độ tạo mạng ngang chặt chẽ hơn, hạt gel trương nở ít, nên hạt nhựa chịu được áp suất cơ học, bền, phù hợp để tách các hợp chất tự nhiên. Các loại nhựa trao đổi A-25 và C-25 thích hợp để sắc ký các hợp chất peptid, protein và nhất là các chất tan có khả năng chui vào bên trong hạt nhựa.

Nhựa Sephadex 50 có lỗ rỗng to hơn, thích hợp để tách các hợp chất đại phân tử. Loại nhựa trao đổi A-50 và C-50 thích hợp để tách các hợp chất đại phân tử.

Bảng 5 cho biết việc lựa chọn loại nhựa tùy theo trọng lượng phân tử của chất khảo sát.

Bảng 4: Một số đặc trưng của các loại nhựa trao đổi ion đang hiện hành.

Tên nhựa	Tính acid base	Nhóm hoạt động	Khả năng trao đổi miliMol H^+ (OH^-)/ g nhựa
SP-Sephadex	Acid mạnh	Sulfoxyl (-SO_3H)	2,3 mmol H^+/ g
CM-Sephadex	Acid yếu	Carboxymetyl	4,5 mmol H^+/ g
QAE-Sephadex	Base mạnh	(2-Hydroxypropyl)--dietyletylamonium	3,0 mmol OH^-/ g
DEAE-Sephadex	Base yếu	Dietylaminoetyl	1,5 mmol OH^-/ g
CM-Agarose	Acid yếu	Carboxymetyl	2,5 mmol H^+/ g
DEAE-Sephacel	Base yếu	Dietylaminoetyl	1,4 mmol OH^-/ g

Bảng 5: Loại nhựa Sephadex và trọng lượng phân tử của chất khảo sát.

Trọng lượng phân tử của chất khảo sát (Da)	Loại nhựa Sephadex thích hợp
< 30.000	A-25, C-25
30.000 – 200.000	A-50 , C-50
> 200.000	A-25, C-25

2. MỘT SỐ KIẾN THỨC CĂN BẢN TRONG THỰC NGHIỆM TRÊN NHỰA TRAO ĐỔI ION

2.1. Chọn loại nhựa trao đổi ion phù hợp

2.1.1. Chọn loại nhựa trao đổi ion tùy vào độ bền của chất khảo sát

Nếu chất cần phân tích là một hỗn hợp, cần phải hiểu biết càng nhiều càng tốt về hỗn hợp đó: hợp chất dễ bị hư hỏng, bền, loại hợp chất

nào cần quan tâm, loại cần loại bỏ... Trường hợp hỗn hợp chứa hai loại hợp chất: một loại dễ bị hư hại và loại kia thì bền, cần chọn nhựa có thể gắn vào hợp chất bền và để cho hợp chất dễ bị hư hỏng được giải ly ra sớm, tránh cho chất đó phải gắn vào nhựa có thể bị hư hại thêm.

Những hợp chất dễ bị hư hỏng cần được thực hiện với nhựa trao đổi ion yếu DEAE hoặc CM.

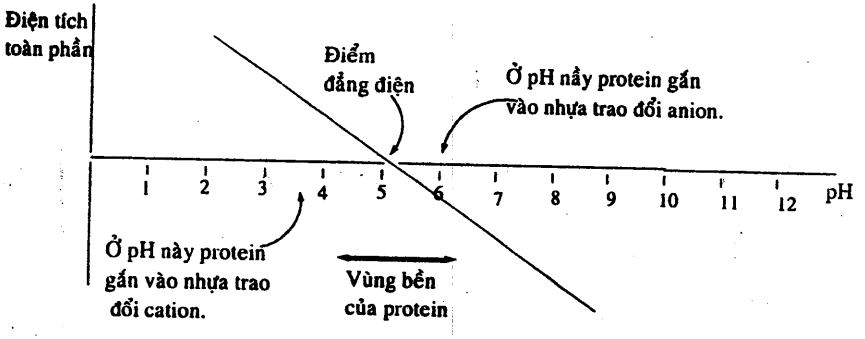
2.1.2. Chọn loại nhựa trao đổi ion tùy theo tính acid/ base mạnh hay yếu của chất khảo sát

Lựa chọn loại nhựa mạnh hay yếu tuỳ vào ảnh hưởng của pH lên trên điện tích của hợp chất cần khảo sát.

Nhựa trao đổi anion mạnh QAE được sử dụng để sắc ký với hợp chất có tính acid yếu, cần pH nhỏ mới có thể biến hợp chất khảo sát thành dạng ion.

Nhựa trao đổi cation mạnh SP được sử dụng để sắc ký với hợp chất có tính base yếu, cần pH lớn mới có thể biến hợp chất khảo sát thành dạng ion.

Nhắc rằng nhựa trao đổi ion tính base mạnh sẽ hấp thu - bắt giữ tất cả các hợp chất nào có tính acid; trong khi đó, loại nhựa trao đổi ion tính base yếu sẽ chỉ hấp thu - bắt giữ hợp chất nào có tính acid mạnh và không bắt giữ được hợp chất có tính acid yếu, và tương tự ngược lại đối với nhựa trao đổi ion tính acid mạnh.



Hình 3: Điện tích toàn phần của protein thay đổi theo pH (Vùng bền của protein trong hình được lựa chọn bất kỳ để minh hoạ)

2.1.3. Chọn loại nhựa trao đổi ion tùy thuộc vào điện tích toàn phần của hợp chất cần khảo sát

Các hợp chất khảo sát chỉ gắn được vào nhựa trao đổi ion khi chúng có mang điện tích ngược dấu với điện tích của nhựa, gắn nhờ vào lực hút tĩnh điện.

Với loại hợp chất chỉ mang một loại điện tích (hoặc điện tích dương hoặc điện tích âm), việc lựa chọn nhựa trao đổi ion sẽ đơn giản. Nhưng với loại hợp chất, thí dụ như các protein (H_2N-CR_2-COOH), là loại hợp chất lưỡng cực, cùng lúc mang cả điện tích dương và điện tích âm, nên điện tích toàn phần của hợp chất đó tuỳ thuộc vào pH. Ở pH nhỏ, điện tích toàn phần của hợp chất là điện tích dương; ở pH lớn, điện tích toàn phần của hợp chất là điện tích âm; ở pH = pI (với pI là điểm đẳng điện của phân tử), hợp chất có điện tích toàn phần là zero. Như vậy, tùy pH, protein có thể gắn vào nhựa trao đổi anion hoặc nhựa trao đổi cation.

✳ Tại pH > pI: phân tử hiện diện ở dạng anion (ion âm H_2N-CR_2-COO) và hợp chất sẽ gắn vào nhựa trao đổi anion.

✳ Tại pH < pI: phân tử hiện diện ở dạng cation (ion dương H_3N^+-CR_2-COOH) và hợp chất sẽ gắn vào nhựa trao đổi cation.

✳ Tại pH = pI: hợp chất có điện tích toàn phần là zero (H_2N-CR_2-COOH), không gắn vào nhựa trao đổi ion nào cả.

Tuy nhiên, mỗi loại protein chỉ ổn định bền trong một khoảng pH nhất định nên việc lựa chọn loại nhựa nào cần phải xem xét đến khoảng bền của protein.

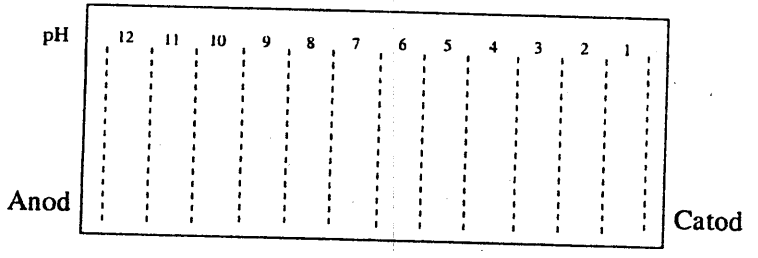
- Nếu protein không bị hư hỏng ở pH lớn hơn điểm đẳng điện pI của nó, có thể sử dụng nhựa trao đổi anion như DEAE hoặc QAE.

- Nếu protein không bị hư hỏng ở pH nhỏ hơn điểm đẳng điện pI của nó, có thể sử dụng nhựa trao đổi cation như CM hoặc SP.

Việc lựa chọn nhựa căn cứ trên vùng pH bền của protein. Vùng bền là vùng ở khoảng lớn hơn và nhỏ hơn một đơn vị so với điểm đẳng điện của

protein. Thí dụ, trong hình 2, vùng bền ở khoảng 4,2 - 6,2, vậy có thể chọn loại nhựa trao đổi anion hoặc cation.

Có thể biết điểm đẳng điện của một protein nhờ vào phương pháp điện di (electrophoresis) đo pI của một protein.



Bảng gel polyacrylamid để điện di đo điểm đẳng điện một hợp chất

Bản gel được tẩm với những acid polyaminopolycarboxylic; áp dụng một điện trường lên tấm gel. Dưới tác dụng của điện trường, các acid sẽ di chuyển và dừng lại tại vị trí pI của nó. Như thế, nhờ dung dịch đệm, mỗi acid sẽ duy trì một vùng nhất định trên bản gel để cho vùng gel đó có pH= pI của nó. Tiếp theo, bản gel này được sử dụng để đo điểm đẳng điện của protein. Khi một chất lưỡng tính được áp dụng lên gel, dưới tác dụng của điện trường, nó sẽ di chuyển đến khi lọt vào vùng gel mà pH của môi trường gel lúc đó bằng giá trị pI của nó, chất sẽ dừng lại.

Không cần xét đến vị trí lúc ban đầu đặt chất lưỡng cực lên bản gel, chất lưỡng cực luôn di chuyển đến vùng có giá trị pH của môi trường gel bằng với giá trị pI của nó. Nhà sản xuất có bán các bản gel có độ phân giải cao cho kết quả với độ sai biệt 0,01 đơn vị pH.

Tuy nhiên, nếu không có điều kiện để đo điểm đẳng điện của chất khảo sát, cũng có phương cách khác để chọn loại nhựa trao đổi ion tùy thuộc vào điện tích toàn phần của hợp chất cần khảo sát, với thí nghiệm như trình bày sau.

a) Dụng cụ và hóa chất cần thiết

- Ống nghiệm đường kính 2 cm, dài 16 cm. Ghi ký hiệu A, B, C, D

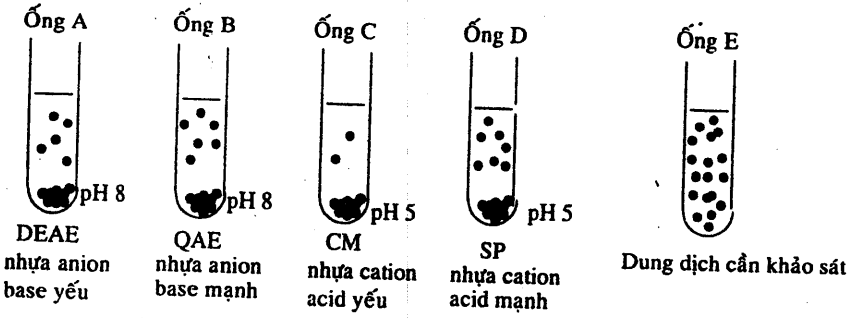
- Các loại nhựa trao đổi ion: DEAE, QAE, CM, SP. Mỗi loại 50 mg khô, mỗi loại chứa trong một ống nghiệm nêu trên.

- Hai loại dung dịch đệm: loại có pH # 5 và loại có pH # 8 (nồng độ 0,1 Mol/lít). Dung dịch đệm pH # 5 sử dụng cho nhựa trao đổi cation CM, SP và dung dịch đệm pH # 8 cho nhựa trao đổi anion DEAE, QAE.

- Dung dịch mẫu chất cần khảo sát, chứa trong ống nghiệm ký hiệu E.

- Máy quang phổ (đo UV).

b) Cách tiến hành (được trình bày trong hình 4).



Hình 4: Qui trình tìm nhựa trao đổi ion phù hợp cho chất cần khảo sát

a) 50 mg nhựa, cân bằng trong dung dịch đệm phù hợp với loại nhựa.

b) Cho vào mỗi ống một lượng thể tích nhất định của dung dịch khảo sát.

Khuấy đều, để yên cho nhựa lắng xuống, hút lấy phần dung dịch nổi lên trên.

c) Đo mức hấp thu quang của dung dịch nổi bên trên đó.

d) Đo mức hấp thu quang của dung dịch mẫu ban đầu trong ống E.

So sánh mức hấp thu quang của năm dung dịch sẽ thấy được loại chất trao đổi ion nào đã hấp thu mạnh hợp chất cần khảo sát.

• Cân bằng nhựa trong dung dịch đệm trước khi gắn chất khảo sát: cho mỗi ống 30 ml dung dịch đệm phù hợp, lắc đều ống nghiệm rồi để yên, gạn bỏ phần dung dịch nổi lên trên và cân bằng một lần nữa. Để yên cho nhựa

lắng xuống đáy ống nghiệm và hút bỏ phần dung dịch nổi lên trên, chỉ chừa lại tổng cộng 10 ml (nhựa và dung dịch đệm).

• Thêm vào mỗi ống nghiệm một lượng thể tích nhất định của mẫu chất cần khảo sát, khuấy trộn nhẹ, đều, để mẫu tiếp xúc với nhựa. Để yên cho nhựa lắng xuống đáy ống nghiệm. Hút lấy phần dung dịch nổi lên trên của mỗi ống A, B, C, D.

• Đo mức hấp thu quang của bốn dung dịch vừa hút và của dung dịch mẫu ban đầu còn chứa trong ống E.

• So sánh mức hấp thu quang của năm dung dịch này, sẽ biết loại nhựa nào đã hấp thu nhiều mẫu chất khảo sát.

Ghi chú: Phương pháp này đôi khi không phù hợp khi hỗn hợp gồm nhiều loại protein có đặc điểm khác nhau, một số loại protein có thể nằm trong dung dịch nổi lên trên và một số protein loại khác lại được hấp thu gắn vào nhựa.

2.2. Thí nghiệm để biết *số lượng nhựa* cần cho *số lượng mẫu* chất khảo sát

Sau khi thực nghiệm như trình bày trong hình 4, biết được nhựa phù hợp để sắc ký trao đổi-ion cho chất khảo sát. Tiếp theo, thực nghiệm như trình bày sau cho biết số lượng nhựa sử dụng để có thể hấp thu hết số lượng mẫu khảo sát.

a) Dụng cụ và hóa chất cần thiết

- Các ống nghiệm đường kính 2 cm, dài 16 cm.

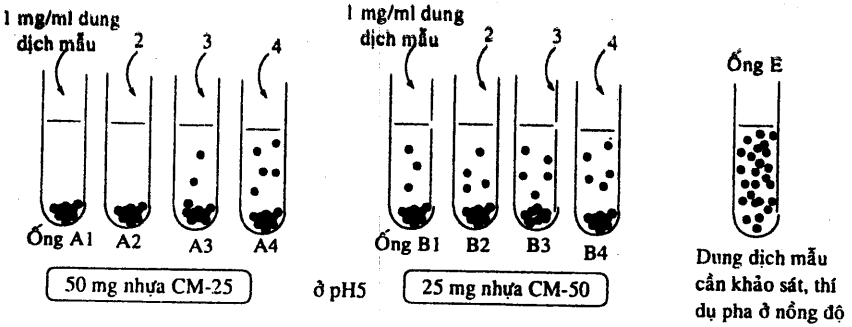
- Loại nhựa trao đổi ion đã được xác định: 50 mg nhựa trao đổi loại A-50 hoặc C-50; hoặc 25 mg nhựa trao đổi loại A-25 hoặc C-25.

- Hai loại dung dịch đệm: loại có pH # 5 và loại có pH # 8 (nồng độ 0,1 Mol/lít). Dung dịch đệm pH # 5 sử dụng cho nhựa trao đổi cation CM, SP và dung dịch đệm pH # 8 cho nhựa trao đổi anion DEAE, QAE.

- Dung dịch mẫu chất cần khảo sát.

- Máy quang phổ (đo UV).

b) Cách tiến hành (được trình bày trong hình 5).



Hình 5: Qui trình tìm lượng nhựa trao đổi ion phù hợp với lượng mẫu chất khảo sát

a) Nhựa được cân bằng trong dung dịch đệm

b) Cho vào mỗi ống một lượng biết trước dung dịch mẫu cần khảo sát.

Khuấy đều, để yên cho nhựa lắng xuống, hút lấy phần dung dịch nổi lên trên.

c) Đo mức hấp thu quang của dung dịch nổi lên trên đó.

d) Đo mức hấp thu quang của dung dịch mẫu ban đầu trong ống E

So sánh mức hấp thu quang của các dung dịch cho biết lượng nhựa cần cho lượng mẫu khảo sát

• Thí dụ, đã chọn nhựa phù hợp là CM, do đó, lấy 50 mg loại nhựa CM-25 và 25 mg loại nhựa CM-50. Tương ứng, sử dụng dung dịch đệm có pH # 5 với nồng độ 0,1 Mol/lít. Mỗi loại nhựa được đựng trong các ống nghiệm.

• Cân bằng nhựa hoàn toàn, bằng cách ngâm nhựa rồi gạn bỏ dung dịch nổi lên trên. Thực hiện nhiều lần, mỗi lần 30 ml dung dịch đệm. Cuối cùng, chỉnh thể tích vừa nhựa vừa dung dịch đệm còn khoảng 10 ml.

• Cho một lượng biết trước của dung dịch hợp chất cần khảo sát (pha trong dung dịch đệm hoặc để nguyên dạng khô). Khuấy trộn nhẹ, đều. Để mẫu tiếp xúc với nhựa. Để yên cho nhựa lắng xuống đáy ống nghiệm. Hút lấy phần dung dịch nổi lên trên của mỗi ống.

• Đo mức hấp thu quang của các dung dịch vừa hút và của dung dịch mẫu ban đầu còn chứa trong ống E.

• So sánh mức hấp thu quang của các dung dịch này, sẽ cho biết lượng xác định nhựa có thể hấp thu bao nhiêu lượng mẫu chất khảo sát.

Dựa vào bảng 2 (ở cuối chương) để chọn nhựa của hãng sản xuất nào, trên nhãn của hộp đựng cho biết *tổng lực mạnh lý thuyết* của nhựa là bao nhiêu; từ đó với kết quả thu được như thực nghiệm trong hình 5, tính toán cho biết số lượng nhựa cần sử dụng là bao nhiêu (thí dụ X g) để có thể gắn hết tất cả lượng mẫu chất cần khảo sát.

Lưu ý, các nghiên cứu cho thấy muốn bảo đảm kết quả thực nghiệm, ***không nên sử dụng vượt quá 10-20% khả năng của nhựa***. Vậy, lấy con số X g nhân lên 5 lần hoặc 10 lần để biết được tổng số lượng nhựa cần thiết để thực hiện sắc ký trao đổi ion.

Với số lượng nhựa tính toán sử dụng, có thể áp dụng để tách bằng cột sắc ký hoặc tách bằng becher đều cho kết quả như nhau.

Minh họa thêm cho phần thực nghiệm trong hình 5 là bảng 6, kết quả nghiên cứu nhựa Sephadex để sắc ký trao đổi ion bắt giữ chất hemoglobin có trọng lượng phân tử 69.000 dalton.

Bảng 6: Khả năng bắt giữ chất hemoglobin của các loại nhựa Sephadex khác nhau.

Nhựa trao đổi-ion	Tổng lực mạnh (dương lượng/gam)	Khả năng của nhựa đối với hemoglobin (g/g).
DEAE A-25	3,5 ± 0,5	0,5
DEAE A-50		5,0
QAE A-25	3,0 ± 0,4	0,3
QAE A-50		6,0
CM C-25	4,5 ± 0,5	0,4
CM C-50		9,0
SP C-25	2,3 ± 0,3	0,2
SP C-50		7,0

Ghi chú: Khả năng của nhựa đối với hemoglobin là số lượng hemoglobin gắn vào 1 gam nhựa khô trong điều kiện thực nghiệm sử dụng dung dịch đệm tris-HCl pH8, nồng độ 0,01 đối với loại nhựa DEAE, QAE và dung dịch đệm acetat pH5, nồng độ 0,01 đối với loại nhựa CM, SP.

2.3. Chọn loại dung dịch đệm

Chọn theo nguyên tắc dung dịch đệm cation sử dụng cho nhựa trao đổi cation, dung dịch đệm anion sử dụng cho nhựa trao đổi anion. Thí dụ: dung dịch đệm anion CH_3COO^- $^+NH_4$ sử dụng cho nhựa trao đổi cation $-COO^-$.

Nên sử dụng dung dịch đệm ở nồng độ 0,1 Mol/lít. Đôi khi người ta thêm vào dung dịch đệm một số hợp chất như: alcol (có khi đến 20% thể tích), dimetylformamid, 7M urea, triton X-100... để giúp cho dung dịch đệm hòa tan tốt các chất cần khảo sát, các protein (nếu để cô lập protein)

Lựa chọn pH và nồng độ dung dịch đệm sao cho khi ở trong dung dịch đệm đó, hợp chất cần khảo sát có điện tích toàn phần ngược dấu với điện tích của nhựa trao đổi nên gắn tốt vào nhựa. Dung dịch đệm phải có pH *lớn hơn một đơn vị* so với điểm đẳng điện của nhựa trao đổi anion, hoặc phải có pH *nhỏ hơn một đơn vị* so với điểm đẳng điện của nhựa trao đổi cation. Các điều kiện về pH và nồng độ dung dịch đệm ở thời điểm bắt đầu quá trình giải ly không được quá khác biệt với điều kiện lúc gắn hợp chất vào nhựa.

Các hợp chất bắt đầu tách rời khỏi nhựa ở khoảng 0,5 đơn vị pH so với điểm đẳng điện của nhựa trao đổi.

Khoảng pH của một số dung dịch đệm thông dụng.	***Giá trị pH***
Acid citric – citrat natri	2,0 – 6,0
Acid formic – format natri	3,0 – 4,5
Acid acetic – acetat natri	4,2 – 5,4
Tris – acid phosphoric	5,0 – 10,0
Hydrogen phosphat natri	5,0 – 7,4
Trietanolamin	6,7 – 8,7

Acid boric – borax	6,8 – 10,0
Tris - acid clohydric	7,5 – 9,5
Amoniac – clorur ammonium	8,2 – 10,2
Borax- hydroxid natri	10,6 – 11,6
Bicarbonat natri – hydroxid natri	9,0 – 12,0

2.4. Làm trương nở nhựa trước khi gắn mẫu chất khảo sát

Giai đoạn cân bằng nhựa, làm nhựa trương nở hoàn toàn để sẵn sàng bắt giữ chất giữ vai trò quan trọng cho quá trình sắc ký trao đổi ion đạt kết quả tốt.

2.4.1. Trường hợp đối-ion của dung dịch đệm *giống với* đối-ion của nhựa

Nhựa cần được trương nở hoàn toàn ở pH sử dụng. Làm trương nở nhựa bằng cách ngâm nhựa vào dung dịch đệm phù hợp ở nhiệt độ phòng trong hai ngày hoặc trong 2 giờ, ở pH trung tính, trên bếp cách thủy. Không được khuấy trộn nhựa một cách mạnh mẽ vì như thế có thể làm hư hỏng các hạt nhựa.

Thực nghiệm tốt nhất như sau: trong một becher, cho 1 gam nhựa khô và dung dịch đệm (# 50 ml), khuấy nhẹ, để yên cho nhựa lắng xuống, chờ một khoảng thời gian ngắn, gạn bỏ phần dung dịch nổi bên trên và thay dung dịch đệm mới vào; thực hiện nhiều lần trong quá trình làm trương nở nhựa; cuối cùng để nhựa trương nở qua đêm trong dung dịch đệm.

Thí dụ, sử dụng nhựa SP-Sephadex ($-O-CH_2-CH_2-CH_2-SO_3^- {}^+Na$) thực hiện với dung dịch đệm "acetat natri–acid acetic", như thế phần đối-ion của nhựa vẫn là Na^+. Lưu ý là ion acetat $-COO^-$ của dung dịch đệm không có gắn vào nhựa.

Sau khi trương nở, hạt nhựa có dạng hình khối cầu, đường kính hạt khoảng 0,1-0,2 mm, có thể quan sát được bằng mắt thường.

2.4.2. Trường hợp đối-ion của dung dịch đệm *khác với* đối-ion của nhựa

Các nhà sản xuất bán hạt nhựa dưới dạng muối: nhựa DEAE, QAE với đối-ion là Cl^- và nhựa CM, SP với đối-ion là Na^+ hoặc H^+ . Vì vậy, nếu trong quá trình thực nghiệm cần sử dụng một loại dung dịch đệm nào đó không phải là Cl^- (hoặc Na^+), mà thí dụ là X^- (hoặc Y^+), trước khi áp dụng sắc ký trao đổi ion, phải chuyển đổi đối ion của nhựa từ Cl^- (hoặc Na^+) trở thành X^- (hoặc Y^+), với thực nghiệm như sau.

Ngâm nhựa trao đổi ion trong một lượng thừa dung dịch đệm muối đối-ion mới, dung dịch đệm này có nồng độ khá đậm đặc 0,5-1 M. Khuấy nhẹ và để yên cho nhựa trương nở hoàn toàn. Lắng gạn, thu lấy nhựa. Thả nhựa vào dung dịch đệm mới (loại dung dịch đệm sẽ sử dụng để bắt đầu phần sắc ký), có nồng độ thấp 0,1M. Thực hiện nhiều lần để nhựa hoàn toàn trương nở trong dung dịch đệm mới.

Thí dụ cần thực hành nhựa DEAE ($-O-CH_2-CH_2-^+NH(C_2H_5)_2, Cl^-$) với dung dịch đệm acetat ammonium ($CH_3COO^- {}^+NH_4$): Trước tiên, nhựa được cho trương nở trong dung dịch đậm đặc acetat ammonium hoặc acetat natri, như thế các ion clorur Cl^- của nhựa được thay thế bằng ion acetat. Lọc, thu lấy nhựa. Tiếp theo, nhựa được cho cân bằng nhiều lần trong dung dịch loãng acetat ammonium (loại sẽ sử dụng).

Muốn kiểm tra xem có còn sự hiện diện của ion clorur: dung dịch nước qua lọc được acid hóa bằng acid nitric và nhỏ vài giọt nitrat bạc 1% sẽ thấy tủa trắng của ion clorur.

✳ ***Thí dụ 1:*** biến đổi nhựa Dowex-50 mang đối-ion là H^+ thành nhựa mang đối ion là Na^+: đặt nhựa vào cột, rửa nhựa nhiều lần, mỗi lần với 100 ml dung dịch NaOH 1N, vận tốc dòng chảy 5-10 ml/phút. Sự chuyển đổi sẽ hoàn toàn khi dung dịch chảy ra khỏi cột có pH> 9. Tiếp theo, nhựa được rửa với nước cho đến khi dung dịch chảy ra khỏi cột có pH < 9.

✳ ***Thí dụ 2:*** biến đổi nhựa Dowex-1 (Cl) mang đối-ion là Cl^- thành nhựa mang đối ion là format $H-COO^-$: rửa nhựa với một lượng lớn thể tích dung dịch NaOH 1N, gấp từ 10-20 lần thể tích cột. Tiếp theo, nhựa được rửa

với nước cho đến khi dung dịch chảy ra khỏi cột có pH< 9. Tiếp theo, nhựa được rửa với dung dịch 1N acid formic cho đến khi dung dịch chảy ra khỏi cột có pH< 2. Cuối cùng nhựa được cân bằng trong dung dịch đệm acid formic–format natri cho đến khi dung dịch chảy ra khỏi cột có pH4,5.

2.5. Tái tạo nhựa - Tồn trữ nhựa trao đổi ion

2.5.1. Tái tạo nhựa

Nhựa trao đổi ion khá đắt tiền, vì thế sau khi sử dụng xong cần được xử lý để có thể tái sử dụng. Qui trình xử lý như sau.

* Loại bỏ hết những hợp chất đã gắn vào nhựa và các chất tạp bẩn khác. Nhựa được đặt trên phễu buchner, rửa nhựa nhiều lần với dung dịch nước muối đậm đặc và nồng độ tăng dần đến 2M/lít nhằm mục đích tách hết những hợp chất đã gắn vào nhựa. Các muối này phải có đối–ion giống với đối–ion của nhựa trao đổi lúc nguyên thủy.

* Các hợp chất tạp bẩn khác thí dụ như lipid, protein,... có thể được loại khỏi nhựa bằng dung dịch NaOH 0,1 M và sau đó phải rửa nhựa với nước cất và với những dung dịch nước muối cho đến khi dung dịch qua lọc hết tính base.

2.5.2. Tồn trữ nhựa

Các nhà sản xuất bán nhựa trao đổi ở dạng khô. Nhựa có tính hút ẩm nên cần tồn trữ nhựa trong lọ đậy nút kín.

Với nhựa đã qua sử dụng có thể tồn trữ trong dung dịch đệm có đối–ion giống với đối–ion của nhựa trao đổi lúc nguyên thủy, có cho thêm chất chống mốc vào dung dịch đệm. Nhựa được đựng ngập trong dung dịch đệm và chai lọ phải đậy thật kín.

Để tồn trữ cho an toàn, có thể sấy khô nhựa với cách thực hành như sau

* Rửa nhựa trên phễu buchner với một lượng thừa dung dịch đệm trung tính, có nồng độ rất loãng, cho đến khi nước rửa không còn vết muối nào.

✳ Làm cho hạt nhựa co thể tích lại bằng cách rửa nhựa với dung dịch alcol có nồng độ tăng dần cho đến khi đạt nồng độ 96%. Với nhựa DEAE, QAE, CM rửa với etanol; với nhựa SP rửa với metanol. Cần phải có thời gian cho mỗi giai đoạn để hạt nhựa co lại từ từ.

✳ Rửa loại bỏ alcol ra khỏi hạt nhựa bằng dietyl eter, rồi sấy khô ở nhiệt độ thấp.

✳ Trữ hạt nhựa khô trong lọ đậy nút kín.

2.5.3. Chất chống nấm mốc cho hạt nhựa trao đổi ion

Khi tồn trữ hạt nhựa trong dung dịch đệm, cần thêm vào dung dịch này những chất chống nấm mốc.

✳ Chất chống nấm mốc dành cho nhựa trao đổi anion: muối phenyl thủy ngân 0,001%; clohexidin 0,002%.

✳ Chất chống nấm mốc dành cho nhựa trao đổi cation: azid natri (NaN_3) 0,02%; thimerosal; etyl tiosalisilat -thủy ngân 0,005%

✳ Chất chống nấm mốc dành cho cả hai loại nhựa: triclorobutanol (tên thương mại là clorethon) 0,05%.

3. SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION, SỬ DỤNG CỘT HOẶC BECHER

3.1. Lựa chọn kích thước cột sắc ký

Nếu biết được số lượng mẫu cần khảo sát, thử nghiệm biết được loại nhựa trao đổi-ion nào phù hợp, xem thông tin về nhựa do nhà sản xuất cung cấp sẽ tính toán được số lượng nhựa cần sử dụng; số lượng nhựa được qui ra thể tích sau khi đã trương nở trong dung dịch phù hợp. Thường thì tỉ lệ giữa thể tích nhựa và thể tích hợp chất cần sắc ký vào khoảng 1:10 đến 1:20.

Để đạt kết quả tốt trong sắc ký trao đổi ion, sử dụng cột ngắn có đường kính lớn.

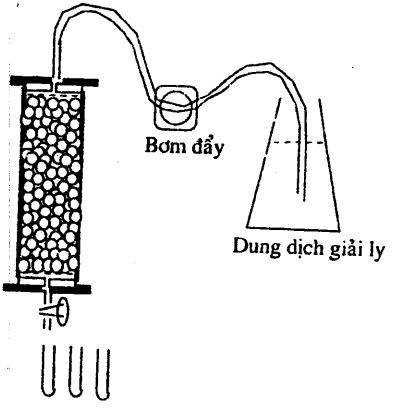
Khác hẳn với sắc ký cột cổ điển, sắc ký trao đổi ion là một qui trình có thể biểu diễn ngắn gọn với hiện tượng ***"đóng / mở"***.

Trong quá trình sử dụng dung môi để giải ly hợp chất ra khỏi cột, một khi đạt đến đúng điều kiện, hợp chất (gọi là chất tan, solute) sẽ không còn bám vào nhựa nữa; mà nếu không còn bám dính vào nhựa, phân tử chất tan đó sẽ hòan toàn tự do, hoà theo dòng chảy của dung môi để đi ra khỏi cột, không kể lúc nó bám vào nhựa, nó ở vị trí nào trong cột, ở vị trí gần đầu cột hay ở xa đầu cột. Vì lý do đó, phần cột (chứa nhựa trao đổi ion) quá dài sẽ không phù hợp cho sắc ký trao đổi ion.

Các nghiên cứu cho thấy cây cột dài có thể làm cho áp suất bên trong của cột bị sụt giảm thất thường (back-pressure problem), làm các hợp chất khuếch tán theo chiều ngang (longitudinal diffusion), làm dải băng rộng thêm ra (band broadening: các chất giống nhau được giải ly ra khỏi cột thành một dải băng, dải băng càng hẹp, kết quả càng tốt) làm ảnh hưởng đến khả năng tách riêng từng loại hợp chất khác nhau của sự sắc ký.

Trong phòng thí nghiệm, người ta thường sử dụng cột có ống hình trụ dài, làm bằng nhựa PTFE, plastic, thủy tinh... hai đầu ống có ven răng cưa. Đậy hai đầu ống bằng hai nút nhựa plastic cũng có ven răng cưa sao cho có thể vặn vừa khít vào đầu ống. Chính giữa mỗi nút có gắn một ống inox, đường kính 1-2 mm, ló ở mỗi hai đầu nút một đoạn khoảng 0,5 cm. Ống nhỏ này dùng để nối dẫn dung dịch giải ly từ bình chứa dung dịch giải ly đi vào trong ống sắc ký. Ở đầu ống, lót bên trong hai nút vặn là một tấm tròn bằng nhựa polyetylen có lỗ rỗng nhỏ để chặn không cho hạt nhựa chảy vào làm bít ống inox.

Các hãng sản xuất có bán sẵn các cột sắc ký dài 7-30 cm. Thường chiều cao của cột vào khoảng 10-20 cm.



3.2. Nhồi nhựa trao đổi vào cột và nạp mẫu cần phân tích vào đầu cột

3.2.1. Nhồi nhựa trao đổi vào cột

Giữ cột thẳng đứng trên giá, khoá vòi bên dưới cột. Nhựa trao đổi ion đã được cân bằng trong trong dung dịch đệm (loại để bắt đầu cho quá trình sắc ký); lượng nhựa và thể tích dung môi sao cho có thể rót nhựa dễ dàng vào cột, không tạo ra những bọt khí nằm giữa các hạt nhựa. Để yên 5-10 phút cho các hạt nhựa lắng xuống, rót đầy cột bằng dung dịch đệm, mở khóa để cho nhựa lắng xuống. Khi nhồi cột hoàn tất, cần cân bằng cột bằng cách cho dung dịch đệm chảy qua cột, cuối cùng kiểm tra pH của dung dịch chảy ra khỏi cột.

3.2.2. Nạp mẫu chất lên đầu cột

Dung dịch mẫu phải được lọc trong suốt trước khi nạp vào cột; lọc bằng tờ giấy lọc hoặc ngang qua một lớp celite.

Lượng mẫu tùy vào lượng nhựa cũng như khả năng trao đổi của nhựa. Điều quan trọng nhất là làm sao để tất cả các cấu tử quan trọng của mẫu chất được hấp thu hết vào nhựa, như thế nghĩa là chú ý đến ***số lượng của mẫu*** hơn là ***thể tích của mẫu***.

Thí dụ muốn tách một hỗn hợp hemoglobin trên cột SP-Sephadex C-50. Các nghiên cứu trước đây cho biết *1 gam nhựa SP-Sephadex C-50 khô có thể gắn 7,0 g* hợp chất hemoglobin. Tuy nhiên, các kết quả thực nghiệm khuyến cáo chỉ thực hiện việc gắn mẫu chất vào nhựa với 10 -20% so với tính toán lý thuyết về lực của nhựa, như thế tỉ lệ cần cho thực nghiệm nên là *0,7g hemoglobin cho 1 gam nhựa khô*. Vậy, nếu muốn sắc ký trao đổi ion để bắt giữ 0,7g hemoglobin thì cần 1 gam nhựa SP-Sephadex C-50. Để nạp mẫu chất lên đầu cột, 0,7g hemoglobin ***trong 2 ml*** dung dịch mẫu hoặc 0,7g hemoglobin ***trong 50 ml*** dung dịch mẫu cũng cho kết quả sắc ký như nhau.

Trong thực nghiệm, một lượng lớn thể tích hỗn hợp có thể được rót lên đầu cột sắc ký mà không cần phải cô đậm đặc dung dịch này.

Để nạp mẫu lên đầu cột: mở khoá để hạ mức dung dịch đệm xuống vừa sát mức nhựa ở trên đầu cột, khóa lại. Dùng pipette hút và đặt dung dịch mẫu

lên đầu cột, mở khóa cho dung dịch mẫu hút vào lớp nhựa ở trên đầu cột. Để yên 10-20 phút để cho mẫu chất tiếp xúc cân bằng với nhựa.

Khi tất cả lượng mẫu đã được gắn lên đầu cột nhựa, cho vài ml dung dịch đệm ban đầu chảy qua cột, nối cột với bình cung cấp dung dịch giải ly.

3.3. Giải ly cột trao đổi ion

Hỗn hợp mẫu chất ban đầu chứa nhiều loại hợp chất khác nhau, nên các hợp chất đó cũng gắn vào nhựa trao đổi-ion với các ái lực khác nhau; muốn lần lượt tách riêng từng loại hợp chất phải áp dụng một trong hai phương pháp sau đây.

3.3.1. Giải ly bằng cách tăng dần pH dung dịch giải ly

Điện tích toàn phần của những phân tử lưỡng cực thay đổi theo pH. Khi pH của môi trường thay đổi sao cho pH đó có giá trị bằng pI của hợp chất, hợp chất sẽ có điện tích toàn phần bằng zero (hợp chất trở thành trung tính), nó không gắn vào nhựa nữa và bị giải ly ra khỏi cột.

Vì vậy sự tăng dần pH của dung dịch giải ly sẽ lần lượt làm cho các chất khác nhau, có pI khác nhau, trở thành trung tính và lần lượt ra khỏi cột.

Thí dụ, ở pH6 các acid carboxylic hiện diện ở dạng anion carboxylat $R\text{-}COO^-$ nên bị hấp thu vào nhựa, khi chỉnh pH của dung dịch giải ly thành pH4, các anion carboxylat được proton hóa biến thành phân tử trung hòa, không còn bám vào nhựa nữa và bị giải ly ra khỏi cột.

Tuy nhiên, trong thực nghiệm, việc tăng dần pH một cách tuyến tính rất khó thực hiện (việc này cũng đồng thời làm gia tăng nồng độ của dung dịch đệm).

3.3.2. Giải ly bằng cách tăng dần nồng độ dung dịch giải ly

Hỗn hợp mẫu chất đang gắn vào nhựa trao đổi ion trong dung dịch đệm có nồng độ thấp. Để có thể tách mẫu chất ra khỏi nhựa thường, cần phải gia tăng lực ion của dung dịch đệm bằng cách cho thêm NaCl vào (sử dụng NaCl cho cả hai loại nhựa trao đổi anion và cation). Khi có thêm NaCl trong dung dịch đệm, ion của dung dịch đệm sẽ cạnh tranh với hỗn hợp mẫu chất, để

dành lấy những nhóm chức hoạt động của nhựa, đẩy hợp chất ra khỏi nhựa, rồi theo dòng chảy đi ra khỏi cột.

Có thể tăng nồng độ dung dịch đệm theo hai phương pháp.

- Thêm NaCl vào dung dịch đệm với nồng độ tăng dần tuyến tính. Kỹ thuật này cần có thiết bị để pha trộn hai dung dịch có nồng độ khác nhau vào chung với nhau.

- Thêm NaCl vào dung dịch đệm với nồng độ tăng dần theo kiểu bậc thang. Kỹ thuật này dễ thực hiện.

Người ta cũng thường cho thêm dung môi hữu cơ vào dung dịch đệm để giảm bớt tương tác với chất nền (back-bone interaction). Đây là hấp lực xảy ra giữa bộ phận ái nước của hợp chất sắc ký với bộ phận ái nước của nhựa trao đổi ion. Hiện tượng này thường thấy rõ khi phân tử cần sắc ký là hợp chất thơm và nhựa làm từ polystyren. Muốn loại bỏ tương tác này, sử dụng hỗn hợp dung môi-muối.

Hơn thế nữa, hỗn hợp dung môi-muối cũng giúp tránh được trường hợp khi môi trường bị điều chỉnh pH, phân tử của mẫu chất trở thành tính trung hòa, không bám vào nhựa mà hòa vào dung dịch giải ly, nhưng lúc đó tính ái nước của phân tử sẽ giảm, nó không hoà tan tốt trong dung dịch giải ly, sẽ kết tủa, nằm lại trong ống sắc ký (thậm chí bám vào phần chất nền của nhựa) làm sai lệch kết quả sắc ký.

Các thí nghiệm thường sử dụng các dung môi hữu cơ như metanol, acetonitril... là loại dung môi hữu cơ có thể hỗn hòa vào nước, giúp hòa tan mẫu chất, không cho chất kết tủa. Thí dụ thí nghiệm với nhựa trao đổi anion Dowex-1, giải ly bằng dung dịch 3% clorur ammonium (khoảng 0,5M) trong 90% hỗn hợp metanol/ nước.

Ngoài ra, các muối hữu cơ thí dụ như hỗn hợp pyridin/ acid acetic có thể tạo nên những dung dịch có pH khác nhau, như trình bày trong bảng 7. Hơn thế nữa, các dung môi này có ưu điểm là có tính bay hơi nên có thể dễ dàng loại bỏ bằng cô quay chân không.

Bảng 7: Thành phần của dung dịch pyridin/acid acetic cho dung dịch với pH khác nhau.

Thành phần của hỗn hợp	pH 3 (ml)	pH 5 (ml)	pH 8 (ml)
Nước	970	970	980
Acid acetic	28	14	0,2
Pyridin	2	16	20

3.4. Vận tốc giải ly cột trao đổi ion

Vận tốc giải ly trung bình khoảng 5-10 ml/ phút đối với cột có thể tích 100 ml. Vận tốc được điều chỉnh tùy theo các yếu tố sau

* *Chiều cao và đường kính của phần nhựa trong cột sắc ký*: Khi giải ly bằng kỹ thuật gia tăng nồng độ NaCl vào dung dịch đệm, càng gia tăng nồng độ NaCl thì hạt nhựa càng bị nén lại, khiến cho chiều cao của phần cột nhựa trong ống sắc ký càng giảm, hệ quả là vận tốc giải ly bị chậm lại.

Muốn tránh điều này, không nên giải ly cột nhờ vào trọng lực, mà nhờ vào một máy bơm đẩy để bơm dung dịch giải ly vào đầu cột.

Nếu gia tăng đường kính cột sắc ký, vận tốc giải ly bị chậm lại.

* *Độ nhớt của dung dịch mẫu*: nếu độ nhớt của dung dịch mẫu tăng, vận tốc giải ly bị chậm lại. Khi gia tăng nhiệt độ, độ nhớt của mẫu tăng lên làm tăng vận tốc giải ly.

* *Loại hạt nhựa*: Nhựa trao đổi ion A-25 và C-25 là hạt rắn chắc, nên không chịu ảnh hưởng khi cho bơm hoạt động ở áp lực mạnh. Nhựa trao đổi ion A-50 và C-50 giống như gel Sephadex G, có một chỉ số chịu lực nhất định (chỉ số trữ nước). Khi cho bơm đẩy hoạt động ở áp lực cao hơn sức chịu đựng qui định, hạt nhựa càng lúc càng ép sát vào nhau (compact) và vận tốc giải ly bị chậm lại.

3.5. Sắc ký trao đổi ion sử dụng becher

Sắc ký trao đổi ion sử dụng cột hoặc becher đều cho kết quả như nhau, điều quan trọng là cần phải thử xem với hỗn hợp mẫu chất ban đầu, loại hợp chất nào sẽ gắn vào nhựa trao đổi: hoặc hợp chất quan trọng hoặc hợp chất

cần loại bỏ. Tuy tách chất bằng kỹ thuật sử dụng cột có hiệu quả hơn nhưng kỹ thuật sử dụng becher cũng có một số ưu điểm riêng như: dụng cụ thiết bị đơn giản, thao tác nhanh chóng, nhất là có thể áp dụng với một lượng lớn mẫu chất (có thể áp dụng về mặt kỹ nghệ).

Các thao tác với các bước như sau.

* Việc lựa chọn loại nhựa, số lượng nhựa, loại dung dịch đệm... được thực hiện giống như đã mô tả trong phần sắc ký sử dụng cột.

* Cho nhựa trương nở trong dung dịch đệm ban đầu. Tiếp theo, cho dung dịch mẫu chất (đã được lọc trong suốt) vào nhựa, đảo trộn nhẹ hỗn hợp trong vòng 15-30 phút và để yên 10 -20 phút để cho mẫu chất gắn chặt tốt vào nhựa.

* Lọc hỗn hợp nói trên ngang qua một phễu buchner: các hợp chất cần khảo sát đã gắn vào nhựa nên ở cùng với nhựa, ở trên phễu; các hợp chất có trong hỗn hợp mẫu chất ban đầu nhưng không gắn vào nhựa sẽ bị lọt xuống bình tam giác bên dưới.

Để bảo đảm không bỏ sót các hợp chất cần khảo sát chưa kịp gắn vào nhựa và bị lọt xuống dịch lọc ở bên dưới, với phần dịch lọc này nên thực hiện một mẽ hấp thu mới với nhựa trao đổi mới.

* Nhựa trao đổi trên phễu được rửa nhiều lần với dung dịch đệm ban đầu để rửa loại bỏ hết tạp chất.

* Các hợp chất cần khảo sát sẽ được lần lượt giải hấp ra khỏi nhựa, bằng cách ngâm nhựa vào dung dịch đệm có nồng độ lớn hơn nồng độ của dung dịch đệm ban đầu. Lần lượt ngâm nhựa vào nhiều dung dịch đệm có nồng độ khác nhau và nồng độ tăng dần: các hợp chất khác nhau sẽ hòa tan vào dung dịch đệm phù hợp.

* Với mỗi loại dung dịch đệm nói trên, lọc ngang qua phễu buchner; dung dịch qua lọc sẽ chứa hợp chất cần khảo sát.

* Thu hợp chất cần khảo sát ra khỏi dung dịch đệm bằng cách cho dung dịch qua lọc chảy ngang qua một cột sắc ký lọc gel với gel Sephadex

G-10. Các ion vô cơ, các ion của dung dịch đệm sẽ bị giữ lại trong cột gel G-10, còn nước chảy ra khỏi cột sẽ chứa chất cần khảo sát.

* Dung dịch qua lọc được đuổi nước bằng máy cô quay chân không ở áp suất thấp hoặc tốt nhất là bằng kỹ thuật đông cô chân không sẽ cho hợp chất cần khảo sát ở dạng bột khô.

4. MỘT SỐ ÁP DỤNG CỦA SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION

Nhiều loại hợp chất có thể được cô lập từ nguyên liệu thô ban đầu bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion: đó là những loại hợp chất acid hoặc base mạnh hoặc yếu, hợp chất lưỡng tính (protein), các enzym, hormon, nucleotid....

Kỹ thuật sắc ký trao đổi ion ít khi được sử dụng một mình riêng lẻ mà thường kết hợp với những kỹ thuật khác như tạo kết tủa, sắc ký lọc gel, điện di....

- ***Tạo kết tủa***: Dung dịch hỗn hợp mẫu chất ban đầu thường có thể tích rất lớn, cần phải sử dụng phương pháp kết tủa để chỉ thu những thành phần cần thiết có lượng thể tích nhỏ, vừa đủ cho việc nạp mẫu lên đầu cột sắc ký trao đổi ion. Tạo kết tủa cũng giúp loại bỏ những *tạp chất chính* trong dung dịch mẫu chất ban đầu.

- ***Sắc ký lọc gel***: Trước khi áp dụng sắc ký trao đổi ion, cần sử dụng sắc ký lọc gel để lọc loại bớt các tạp, chỉ giữ lại những thành phần cần thiết trong dung dịch hỗn hợp mẫu chất ban đầu.

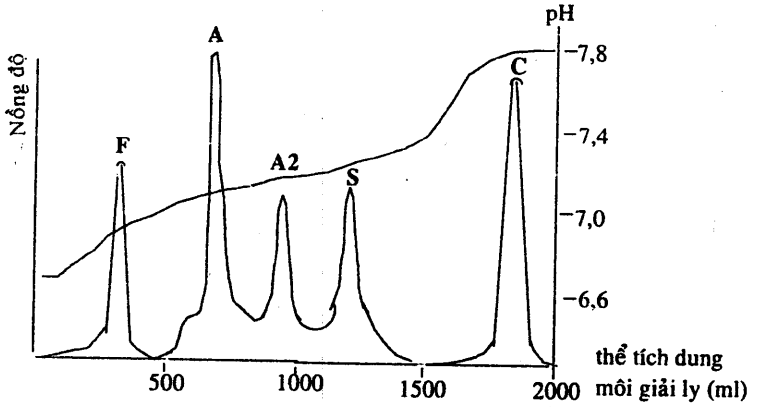
Các phân đoạn thu được từ quá trình sắc ký trao đổi ion luôn có chứa muối, muối này sẽ được loại bỏ bằng cách cho dung dịch của từng phân đoạn chảy ngang qua một cột sắc ký gel với gel Sephadex G-10 hoặc G-25.

- ***Điện di***: Được sử dụng để khảo sát từng phân đoạn của sắc ký trao đổi ion, giống như sử dụng sắc ký lớp mỏng để theo dõi từng phân đoạn của sắc ký cột silica gel.

Sau đây là một số áp dụng để sắc ký trao đổi ion.

• Tác giả Dozy và Huisman đã sử dụng nhựa CM-Sephadex C-50, kích thước cột nhựa 0,9 x 60 cm, giải ly bằng dung dịch đệm tris-acid maleic có

pH tăng theo kiểu bậc thang từ pH6,5 đến pH8,0 với vận tốc 0,33 ml/phút để tách hỗn hợp hemoglobin thành những hemoglobin F, A, A_2, S và C. Sắc ký đồ được trình bày trong hình 6.



Hình 6: Sắc ký đồ tách hỗn hợp hemoglobin bằng nhựa CM-Sephadex C-50

4.1. Các hợp chất anion

Với các ***hợp chất anion*** có thể hấp thu ở pH thấp, ***sử dụng nhựa trao đổi anion mạnh hoặc yếu*** đều được. Ở pH nhỏ hơn 4, các acid carboxylic không bị giữ lại, là do sự hấp thu có tính chọn lọc tương đối lên nhựa có acid mạnh.

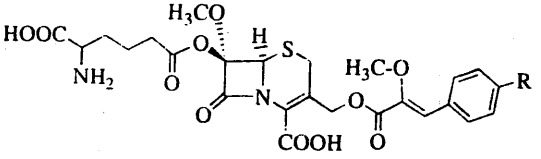
Với hợp chất khảo sát không bền trong môi trường acid, không thể áp dụng kỹ thuật này được, vì sự tách dựa vào tính pKa; phải chọn phương án khác là cho hợp chất hấp thu *lên nhựa trao đổi anion mạnh*, ở môi trường trung tính, và giải ly bằng dung dịch muối.

Nếu sử dụng *nhựa trao đổi anion yếu*, sự giải ly được thực hiện bằng dung dịch có tính base, dĩ nhiên, sẽ không thể thực hiện được nếu hợp chất không bền trong môi trường base.

4.1.1. Các hợp chất Cephamycin A và B.

Đây là các thuốc kháng sinh loại cephalosporin được phát hiện vào những năm 1970. Qui trình cô lập được trình bày như sau, nhờ vào sự trao đổi ion sau khi đã loại bỏ muối trên dung dịch lên men. Qui trình này phù hợp

với các dung dịch lên men có nồng độ muối cao. Các hợp chất trong dung dịch lên men được cho hấp thu lên nhựa trao đổi anion yếu và giải ly với ion nitrat.



Cephamycin A (R= O-SO_3H)
Cephamycin B (R= OH)

1) Dung dịch lên men được acid hóa và lọc. Cho dung dịch qua lọc đi ngang qua một cột XAD-2. Giải ly bằng dung dịch metanol: nước (6:4).

2) Dung dịch giải ly được cô đặc và được điều chỉnh pH3,5 bằng dung dịch nước NH_4OH. Dung dịch này được pha loãng với nước, cùng thể tích, và cho đi ngang qua một cột Amberlit IRA-68 (Cl). Giải ly cột này với dung dịch 1M $NaNO_3$ cộng thêm 0,1 M NaOAc (pH7,5), hứng thành từng phân đoạn.

3) Thử nghiệm hoạt tính sinh học của mỗi phân đoạn; tùy theo kết quả thử nghiệm, gom các phân đoạn lại.

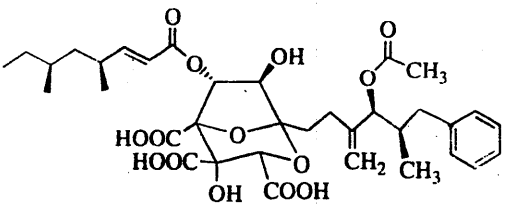
4) Các phân đoạn dương tính được điều chỉnh pH 3,0 và được loại muối bằng XAD-2. Dung dịch loại muối được điều chỉnh pH4 và đông cô chân không. Hoà tan bột khô đông cô chân không trong một lượng nhỏ thể tích dung dịch đệm 0,5 M NH_4Br-0,05 M AcOH. Sắc ký trên DEAE Sephadex A-25, giải ly với cùng loại dung dịch đệm.

5) Thử nghiệm hoạt tính sinh học cho mỗi phân đoạn, và tìm ra phân đoạn có chứa Cephamycin A và B.

6) Phân đoạn có chứa Cephamycin A và B được cho hấp thu lên XAD-2 và giải ly bằng dung dịch metanol: nước (9:1).

4.1.2. Các hợp chất acid zaragoric

Acid zaragoric được phát hiện trong quá trình nghiên cứu các chất ức chế enzym tổng hợp squalen.



Acid zaragoric

Cấu trúc của hợp chất gồm một nhân mang ba nhóm acid carboxylic có tính phân cực mạnh, nhân này nối với hai dây béo có tính kém phân cực. Do hợp chất có cấu trúc mang hai loại nhóm có tính phân cực khác xa nhau nên việc cô lập hợp chất này bằng sắc ký trao đổi ion bằng Dowex-1 gặp nhiều khó khăn, các vệt sắc ký bị kéo dài. Điều này được lý giải do có sự tương tác giữa hợp chất với chất nền-giá mang nhóm chức hoạt động của sắc ký trao đổi ion.

Chiết hợp chất ra khỏi dung dịch lên men ban đầu bằng etyl acetat ở pH 2. Tiếp theo chọn nhựa trao đổi ion mang tính base yếu Amberlyst A-21 và sử dụng với dung dịch đệm acetat. Đối-ion acetat có tính base đủ mạnh (pK_a= 5) để khử proton các acid zaragoric (có pK_a1 = 3,5), hệ quả của pH này là biến phân tử thành monocarboxylat, hấp thu chọn lọc lên nhựa trao đổi ion. Kế đến, giải ly bằng dung dịch metanol: nước (9:1) có thêm 3% clorur amonium. Dung dịch giải ly được loại muối bằng Diaion HP-20 cho sản phẩm với độ tinh khiết 80%.

4.2. Các hợp chất cation

Tương tự các hợp chất có tính acid mạnh, *các hợp chất có tính base mạnh* có thể được tách ở giá trị pH cao, *bằng nhựa trao đổi cation yếu hoặc mạnh*. Trong điều kiện thực nghiệm như thế, các hợp chất có tính base yếu sẽ không bị proton hóa và không bị nhựa giữ lại.

Nếu dùng *nhựa trao đổi cation mạnh*, thực hiện giải ly bằng dung dịch muối; nếu dùng *nhựa trao đổi cation* yếu, hợp chất cũng có thể bị giải ly nếu sử dụng dung dịch giải ly có pH thấp, đủ để vượt qua sự ion hóa của nhựa trao đổi. Nếu hợp chất khảo sát không bền trong môi trường kiềm, nên cho hợp chất được hấp thu lên nhựa trao đổi cation yếu, ở pH trung tính và giải ly

bằng dung dịch muối hoặc giải ly bằng dung dịch acid mạnh nếu hợp chất chịu được điều kiện acid.

Cho các *hợp chất có tính base yếu* hấp thu trên *nhựa trao đổi cation mạnh*. Muốn tách ra khỏi nhựa (là base mạnh), phải giải ly bằng dung dịch có tính base yếu, dung dịch đệm được chỉnh sao cho có giá trị pH cao hơn từ 1-2 đơn vị pKa của hợp chất. Thực nghiệm thường sử dụng dung dịch nước-pyridin. Nếu hợp chất khảo sát không bền trong môi trường kiềm, không thể tách nó ra khỏi nhựa trao đổi cation mạnh, không thể sử dụng qui trình sắc ký trao đổi ion được.

4.2.1. Hợp chất Palau'amin

Palau'amin, hợp chất thiên nhiên (thường hay kết hợp với guanidin) được cô lập từ một loại rong biển ở nam Thái Bình Dương, là loại thuốc kháng sinh. Hợp chất có cấu trúc mang nhiều nhóm chức tính base, nên được cô lập bằng dung dịch nước và nhờ vào sắc ký trao đổi cation yếu.

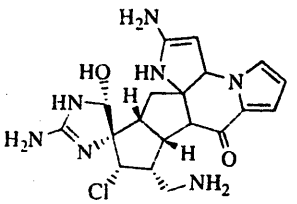
Ở điều kiện pH gần trung tính, nhựa trao đổi cation yếu carboxymetyl sẽ mang điện tích âm, trong khi đó, guanidin bị proton hóa, với qui trình cô lập như sau.

1) Đông khô chân không rong biển và trích rong bằng metanol. Đuổi dung môi thu được cao chiết, nghiền cao chiết với nước. Cho dung dịch nước đi ngang qua cột Cellex CM (Na), giải ly cột bằng dung dịch nước muối NaCl với nồng độ muối tăng dần theo bậc thang.

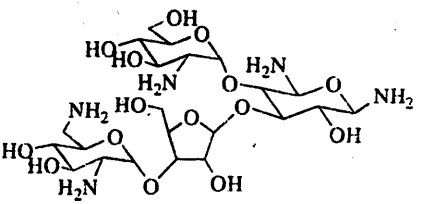
2) Các phân đoạn được thử nghiệm hoạt tính sinh học; phân đoạn có hoạt tính là phân đoạn được giải ly bằng 0,5M NaCl.

3) Phân đoạn có hoạt tính được đông khô chân không, và bột đông khô này được nghiền trong etanol để loại bỏ muối.

4) Bột đông khô sau khi được loại muối được cho đi ngang qua một cột Sephadex LH-20 (metanol) thu được Palau'amin.



Palau'amin



Paromomycin

4.2.2. Hợp chất Paromomycin

Paromomycin là thuốc kháng sinh rất hiệu quả đối với các loại vi khuẩn gram âm (Gram-negative organism). Paromomycin là loại aminoglycosid tan tốt trong nước, được cô lập từ những năm 1960 bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion.

1) Chỉnh dung dịch nước lên men ở pH 3 và lọc. Dung dịch nước qua lọc lại được chỉnh ở pH 7 với NaOH.

2) Cho dụng dịch lọc đi ngang qua cột Amberlite IRC-50 ($^{+}NH_4$). Trước tiên, giải ly bằng nước cất, tiếp theo bằng dung dịch nước NH_4OH 0,5N. Hứng những phân đoạn.

3) Các phân đoạn được thử nghiệm hoạt tính sinh học.

4) Phân đoạn có hoạt tính được cô đậm đặc ở áp suất thấp và được chỉnh ở pH 7, rồi cho đi ngang qua cột Amberlite CG-50 (NH_3), giải ly bằng nước cất (3 lần thể tích cột), kế đó bằng dung dịch NH_4OH có nồng độ tăng dần từ 0,05 đến 0,3 N.

5) Các phân đoạn lại được thử nghiệm hoạt tính sinh học. Phân đoạn có hoạt tính được cô đậm đặc ở áp suất thấp cho đến khô.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. **Richard J.P. Cannell**. *Natural products isolation.* Humana Press. Totowa, New Jersey. 1998.

[2]. **A. Braithwaite, F.J. Smith**. *Chromatographic methods.* Kluwer Academic Publishers. Boston. London, 45-501, 1999.

[3]. **Whatman**. *Advanced Ion Exchange Cellulose Laboratory Manual.* Whatman Chemical Separation Inc. England. 1981.

Bảng 2a: Nhựa trao đổi anion mạnh

Nhựa	Nhà sản xuất	Nhóm chức	Đối -ion	Giá mang nhóm chức	Khả năng (meq/100 ml)	Khoảng pH	Kích thước của hạt (mesh và µm)
Dowex- IX2-100	Dow Chemicals	Trimetylbenzyl -amonium	Cl^-	Polystyren 2% tạo mạng ngang	70	0 - 14	50 – 100 mesh 150 – 250 µm
Dowex- IX8-400	Dow Chemicals	Trimetylbenzyl -amonium	Cl^-	Polystyren 8 % tạo mạng ngang	120	0 - 14	200 – 400 35 – 75
Amberlit IRA-400	Rohm and Haas	Amonium tứ cấp	Cl^-	Polystyren 8 % tạo mạng ngang	140	0 - 14	16 – 50 500 – 1000
Amberlit IRA-900	Rohm and Haas	Trimetylbenzyl -amonium	Cl^-	Polystyren có lỗ rỗng	100	0 - 14	16 – 50 500 – 1000
Amberlite CG 400	-	$-CH_2{}^+NR_3$	Cl^-	Polystyren 8 % tạo mạng ngang	3,8 mmol/g nhựa khô	0 - 12	Đủ loại
Diaion SA10A	Mitsubishi	Trimetylbenzyl -amonium	Cl^-	Polystyren	130	0 - 14	40 – 60 350 – 550
Diaion SA20A	Mitsubishi	Dimetylbenzyl -hydroxyetylamonium	Cl^-	Polystyren	130	0 - 14	40 – 60 350 – 550
Diaion PA312	Mitsubishi	Trimetylbenzyl -amonium	Cl^-	Polystyren có lỗ rỗng 6 % tạo mạng ngang	120	0 - 14	16 – 50 500 – 1000
QAE-Sephadex A-25	Pharmacia	Aminoetyl tứ cấp	Cl^-	Dextran	50	2 - 12	100 – 400 40 – 120
TSKgel SAX	TosoHaas	Amonium tứ cấp	Cl^-	Polystyren Divinylbenzen	> 370	1 - 14	> 400 5

Bảng 2b: Nhựa trao đổi anion yếu

Nhựa	Nhà sản xuất	Nhóm chức	Đối -ion	Giá mang nhóm chức	Khả năng (meq/100 ml)	Khoảng pH	Kích thước của hạt (mesh và µm)
DEAE- Sephadex A-25	Pharmacia	Dietylaminoetyl	Cl^-	Dextran	50	2 - 12	100 – 400 40 – 120
Amberlit IRA-35	Rohm and Haas	Dietylaminoetyl	Base tự do	Acrylic DVB tạo mạng ngang	110	0 - 9	16- 50 500 – 1000
Amberlit IRA-68	Rohm and Haas	Dietylaminoetyl	Base tự do	Acrylic DVB tạo mạng ngang	160	0 - 7	16- 50 500 – 1000
Amberlit A-21	Rohm and Haas	Dietylaminoetyl	Cl^-	Styren DVB tạo mạng ngang	260	0 - 9	500
Amberlit CG 45	-	$-CH_2{}^+NR_2$	Cl^-	Styren DVB tạo mạng ngang	5 mmol/g nhựa khô	0 - 9	Đủ loại
Diaion WA 10	Mitsubishi	Dietylaminoetyl	Base tự do	Polyacrylat	120	0 - 9	40 – 60 350 – 550
Diaion WA 20	Mitsubishi	Polyamin	Base tự do	Polystyren có lỗ rỗng	250	0 - 9	40 – 60 350 – 550
TSKgel DEAE- 5 PW	TosoHaas	Dietylaminoetyl	Cl^-	Polystyren có lỗ rỗng 6 % tạo mạng ngang	> 10	2 - 12	> 400 10
TSKgel DEAE- 2 SW	TosoHaas	Dietylaminoetyl	Cl^-	Silica	> 30	2 – 7,5	> 400 5

Bảng 2c: Nhựa trao đổi cation mạnh

Nhựa	Nhà sản xuất	Nhóm chức	Đối -ion	Giá mang nhóm chức	Khả năng (meq/100 ml)	Khoảng pH	Kích thước của hạt (mesh và µm)
SP-Sephadex A-25	Pharmacia	Sulfopropyl	Na^+	Dextran	30	2 - 12	100 – 400 40 – 120
Dowex - 50X 2-100	Dow chemicals	Acid sulfonic	H^+	Polystyren 2% nối mạng ngang	60	0 - 14	50- 100
Dowex - 50X 8-100	Dow chemicals	Acid sulfonic	H^+	Polystyren 8% nối mạng ngang	170	0 - 14	50- 100
Diaion SK 1B	Mitsubishi	Acid sulfonic	Na^+	Polystyren	190	0 - 14	40 – 60 400 – 600
Diaion SK 112	Mitsubishi	Acid sulfonic	Na^+	Polystyren 12% nối mạng ngang	210	0 - 9	16 – 50 500 – 1000
A iberlite IR- 122	Rohm and Haas	Acid sulfonic	Na^+	Polystyren 10% nối mạng ngang	210	0 - 14	16 – 50 500 – 1000
Amberlite CG-120	-	$-SO_3H$	Na^+	Polystyren 8 % nối mạng ngang	5mmol H^+ / g nhựa khô	1 - 14	Đủ loại
TSKgel SP- 5 PW	TosoHaas	Acid sulfonic	Na^+	Metacrylat	> 10	2 - 12	> 400 10
TSKgel SCX	TosoHaas	Acid sulfonic	Na^+	Polystyren/divinylbenzen	> 420	1 - 14	> 400 5

Bảng 2d: Nhựa trao đổi cation yếu

Nhựa	Nhà sản xuất	Nhóm chức	Đối - ion	Giá mang nhóm chức	Khả năng (meq/100 ml)	Khoảng pH	Kích thước của hạt (mesh và μm)
CM- Sephadex A-25	Pharmacia	Carboxymetyl	Na^+	Dextran	56	2 - 12	100 – 400 40 – 120
Amberlite IRC- 50	Rohm and Haas	Acid carboxyl	H^+	Polystyren 4% nối mạng ngang	350	5 - 14	16- 50 500 – 1000
Amberlite CG- 50	-	-COOH	H^+	Polystyren 2% nối mạng ngang	10 mmolH^+/g nhựa khô	5 - 14	Đủ loại
Diaion WK 10	Mitsubishi	Acid carboxyl	H^+	Polymetacrylat có lỗ rỗng	250	5 - 14	40 – 60 350 – 550
Diaion CR 10	Mitsubishi	Acid carboxyl	H^+	Polystyren	50	1 - 5	40 – 60 350 – 550
Duolit C-433	Rohm and Haas	Acid carboxyl	H^+	Polystyren	420	5 - 14	16- 50 500 – 1000
Cellex CM	Bio-Rad	Carboxymetyl	H^+	Cellulose	70	5 - 12	200 - 400
TSKgel CM- 3 SW	TosoHaas	Carboxymetyl	Na^+	Silica	> 30	2 – 7,5	> 400 10

CÁC PHƯƠNG PHÁP CÔ LẬP HỢP CHẤT HỮU CƠ

Chương 6

SẮC KÝ GEL

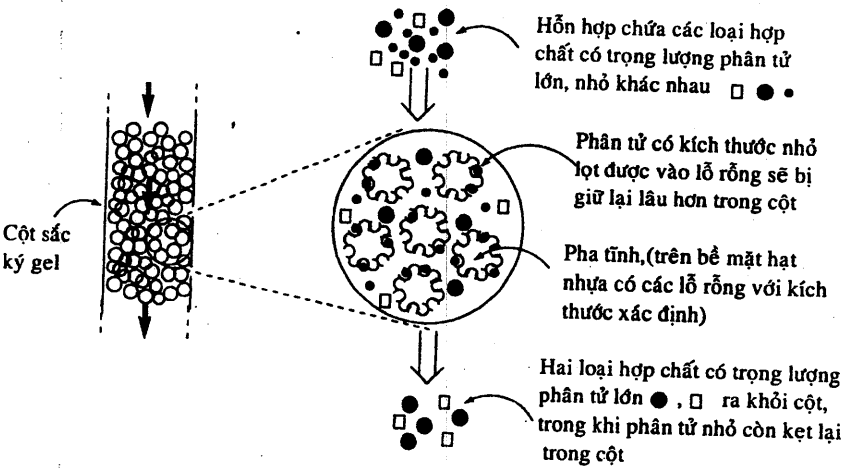
Kích thước và trọng lượng là những đặc tính quan trọng của một hợp chất hóa học. Trong một hỗn hợp gồm nhiều loại hợp chất khác nhau, có thể dựa vào sự khác biệt về trọng lượng phân tử của những hợp chất có trong hỗn hợp để đề xuất những qui trình chiết tách riêng các hợp chất đó. Như trong việc so sánh giữa những hợp chất đồng đẳng, các hợp chất nào có trọng lượng phân tử lớn hơn sẽ có nhiệt độ nóng chảy hoặc nhiệt độ sôi cao hơn. Trong thực nghiệm, sự khác biệt về trọng lượng phân tử còn dẫn đến sự khác biệt về độ phân cực, điện tích toàn phần,... dẫn đến những tính chất khác nhau trong quá trình kết tinh lại, chưng cất, chiết tách hoặc sắc ký. Sự sắc ký dựa vào kích thước của hợp chất là phương pháp căn bản trong hoá học các hợp chất đại phân tử.

Sắc ký gel đã được Mould D.L. phát triển từ năm 1954 để tách các hợp chất không mang điện tích theo thứ tự trọng lượng phân tử của chúng. Nguyên tắc sắc ký không thay đổi nhưng tên gọi thay đổi theo thời gian: năm 1959, các tác giả Porath và Flodin gọi là "gel filtration". Năm 1964, tác giả Moor gọi là "gel permeation chromatography". Cuối cùng, cũng năm 1964, Determann đề nghị gọi là "gel chromatography" và danh từ "sắc ký gel" được sử dụng thống nhất trong bài này.

1. NGUYÊN TẮC CĂN BẢN CỦA SẮC KÝ GEL

Trong sắc ký gel, pha tĩnh là mạng polymer có lỗ rỗng và các lỗ rỗng này được phủ đầy dung môi dùng làm pha động. Các lỗ rỗng phải có kích thước đồng nhất vì kích thước của lỗ giữ vai trò quan trọng trong quá trình sắc ký: một hỗn hợp gồm nhiều hợp chất có trọng lượng phân tử khác nhau có thể

tách riêng được hay không là tuỳ vào kích thước của lỗ rỗng. Các phân tử có kích thước to hơn lỗ rỗng, không thể chui lọt vào bên trong lỗ rỗng, nhanh chóng theo dòng chảy của pha động đi ra khỏi cột; các phân tử có trọng lượng phân tử nhỏ hơn kích thước của lỗ rỗng, sẽ toàn phần hoặc bán phần lọt vào lỗ rỗng, tuy rằng cuối cùng rồi cũng theo dòng chảy đi ra khỏi cột nhưng sẽ chậm trễ hơn.



Hình 1: Nguyên tắc của sắc ký gel

Dòng chảy của pha động khiến cho các phân tử lớn không thể chui vào lỗ rỗng của mạng gel, nhanh chóng đi xuyên ngang qua cột, ra khỏi cột, trong khi phân tử nhỏ ra khỏi cột lâu hơn vì còn phải mất thì giờ chui vào rồi đi ra khỏi lỗ rỗng của gel. Như vậy, các thành phần khác nhau của hỗn hợp mẫu khi đi ngang qua cột sắc ký gel, sẽ ra khỏi cột lần lượt theo trọng lượng phân tử, phân tử lớn đi ra khỏi cột trước, phân tử nhỏ đi ra khỏi cột sau.

Tất cả các loại phân tử lớn cùng bị giải ly ra khỏi cột một lượt và không thể tách riêng các loại phân tử này. Tương tự, tất cả các loại phân tử nhỏ chui lọt hoàn toàn vào lỗ rỗng của hạt gel cũng không thể tách riêng chúng được. Các phân tử có kích thước trung bình sẽ bị giữ lại trong cột tùy vào mức độ chui vào lỗ rỗng của hạt.

Lực hấp thu trên bề mặt hạt gel không được kể đến, vì thế sắc ký gel được xem như một loại sắc ký phân chia. Pha tĩnh lỏng là chất lỏng nằm trong hệ mạng, pha động là dung môi di động phủ tất cả phần còn lại của cột sắc ký. Tóm lại, đây là loại sắc ký phân chia giữa hai pha lỏng, pha tĩnh lỏng và pha động lỏng, mà cả hai pha có thành phần hóa học giống nhau.

2. CÁC NGUYÊN LIỆU LÀM THÀNH HẠT GEL CỦA SẮC KÝ GEL

Việc tách trong sắc ký gel tùy vào đặc điểm của lỗ rỗng trong hệ mạng không gian ba chiều. Hạt gel phải có kích cỡ giống nhau, có tính trơ về mặt hóa học, bền về mặt cơ học, các lỗ rỗng trong hạt gel phải có hình dạng đồng nhất.

Mỗi loại gel có khả năng xác định trong việc tách một loại trọng lượng phân tử, tùy vào kích thước của lỗ rỗng trong hạt gel. Vì thế, nếu muốn tách một hỗn hợp chứa nhiều loại hợp chất *có nhiều loại trọng lượng phân tử khác nhau* thì phải sử dụng một loạt những loại gel khác nhau, để mỗi loại sẽ tách riêng một nhóm hợp chất có khoảng trọng lượng phân tử xác định.

Các nhà sản xuất có những loại gel thương mại rất tốt, tuy nhiên các loại gel đó không chịu được những điều kiện acid hoặc base quá mạnh. Các nhà sản xuất cũng ít có loại gel với lỗ rỗng lớn vì các hạt gel này kém bền cơ học: trong quá trình giải ly nếu sử dụng một áp lực nhỏ, hạt gel dễ bị bóp méo, biến dạng, làm ảnh hưởng đến vận tốc dòng chảy của pha động.

Giống như các loại gel trong kỹ thuật sắc ký khác, hạt gel trong sắc ký gel có dạng hình cầu. Hạt gel có kích thước càng nhỏ càng tốt vì như thế bảo đảm dòng chảy.

Bảng 1 trình bày một số loại gel thương mại.

Có hai loại nguyên liệu chính để chế tạo gel là xerogel và aerogel. Xerogel là loại gel cổ điển, là một polymer được tạo mạng ngang; khi cho tiếp xúc với dung môi, gel sẽ trương nở để tạo thành mạng gel với các lỗ rỗng tương đối mềm. Trong hệ gel này các lỗ rỗng là khoảng trống giữa những chuỗi dây trong hệ thống mạng. Nếu dung môi được loại khỏi hệ thống mạng, cấu trúc gel bị xụp đổ; nếu cho dung môi trở lại, đôi khi có thể khôi phục lại hệ mạng đó.

Ngược lại, aerogel là nguyên liệu rắn chắc và không phải là gel, thí dụ như thủy tinh có lỗ rỗng hoặc silica có lỗ rỗng. Đó là nguyên liệu rắn có lỗ rỗng (porous solid), dung môi có thể chui vào các lỗ rỗng này, nếu dung môi được loại khỏi hệ thống mạng, cấu trúc gel không bị xụp đổ.

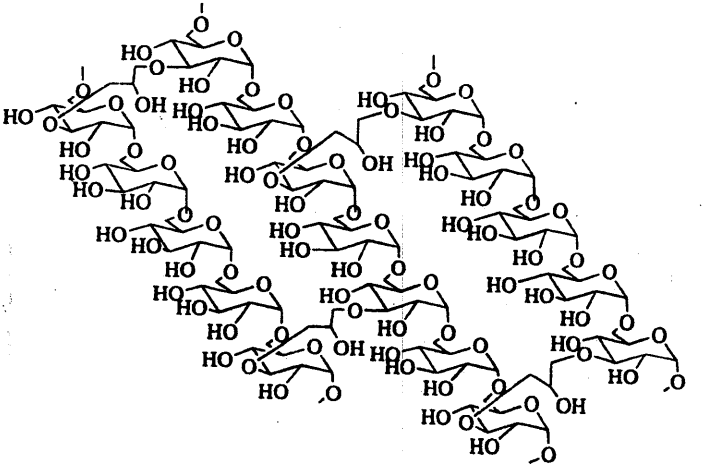
Sau này, các nhà sản xuất có nguyên liệu lai trộn giữa xerogel và aerogel, thí dụ như polystyrene. Loại nguyên liệu này có cấu trúc khá rắn chắc, nhưng trương nở có mức độ khi tiếp xúc với dung môi.

Khác với polystyrene rắn chắc, khi thực nghiệm với loại gel xerogel, agarose (agarose là trường hợp ngoại lệ khác thường), cần phải cẩn thận chú ý vì các hạt gel có thể bị bể vỡ, kết tụ lại làm ảnh hưởng đến vận tốc giải ly cột.

2.1. Gel dextran (tên thương mại là gel Sephadex)

2.1.1. Cấu trúc của gel Sephadex

Gel dextran với tên thương mại là gel Sephadex, loại gel được điều chế đầu tiên và vẫn còn thông dụng hiện nay. Gel dextran là polysacarid thiên nhiên, mạch thẳng, nghĩa là chuỗi dây polyglucose nối với nhau bởi nối α-1,6. Nguyên liệu này không hòa tan trong nước.



Hình 2: Cấu trúc hóa học của gel dextran (Sephadex)

Mỗi chuỗi dây polysacarid của dextran được tạo mạng ngang, bởi nối glyceryl, giữa các nhóm –OH khi cho phản ứng với hợp chất epiclorohydrin trong dung môi hữu cơ ở điều kiện kiềm. Sản phẩm tạo thành là chất rắn, dạng hình cầu, không tan trong nước, nhưng có tính ái nước cao vì có mang nhiều nhóm hydroxyl. Vì tính ái nước cao, nên hạt gel sẽ trương nở trong những dung dịch có nước; một gam gel khô có thể ngậm được 1-20 ml nước.

Trong quá trình thực hiện phản ứng, thay đổi tỉ lệ giữa dextran và epiclorohydrin, sẽ làm thay đổi độ tạo mạng ngang, từ đó có thể điều chế các loại gel với lỗ rỗng kích cỡ khác nhau.

Gel Sephadex không tan trong nước, bền trong các dung dịch nước muối, dung dịch kiềm, cả trong dung môi hữu cơ. Chỉ khi tiếp xúc lâu với acid vô cơ mạnh, mới có thể thủy giải được nối glycosic; còn nếu tiếp xúc trong 2 giờ với dung dịch acid như HCl 0,1N vẫn không bị ảnh hưởng. Thực nghiệm sắc ký cột với acid formic 88% với gel G-50 vẫn không bị hư hại. Gel ổn định an toàn trong khoảng pH 2-12.

Gel Sephadex thương mại thường có ghi kèm chỉ số để chỉ lượng nước mà gel khô cần hút lấy để thành gel trương nở.

Bảng 2 cho biết một số loại gel Sephadex thương mại. Bảng 3 cho biết thời gian cần thiết để làm trương nở gel Sephadex.

Bảng 2: Một số loại gel dextran Sephadex G và tính chất của gel.

Loại gel Sephadex G	Kích thước hạt gel khô (μ)	Lượng nước gel có thể hút (ml/g)	Thể tích gel nở trong nước (ml/g)	Khả năng tách các hợp chất theo trọng lượng phân tử	
				Peptid, protein hình cầu	Các phân đoạn dextran
G-10	40 -120	1,0 ± 0,1	2 - 3	0 - 700	0 - 700
G-15	40 -120	1,5 ± 0,1	2,5 – 3,5	0 - 1.500	0 - 1.500
G-25, thô	100 - 300	2,5 ± 0,2	4 - 6	0 - 1.500	100 – 5.000
G-25, trung bình	50 -150				
G-25, mịn	20 - 80				
LH-20	25 -100	2,1	4,0 - 4,5	-	-
G-50, thô	100 - 300	5,0 ± 0,3	9 - 11	1 – 30.000	500 – 10.000
G-50, trung bình	50 -150				
G-50, mịn	20 - 80				

G-75	40 -120	7,5 ± 0,5	12 – 15	3 – 70.000	1 – 50.000
G-100	40 -120	10,0 ± 1,0	15 – 20	4 – 150.000	1 – 100.000
G-150	40 -120	15,0 ± 1,5	20 – 30	5 – 400.000	1 – 150.000
G-200	40 -120	20,0 ± 2,0	30 – 40	5 – 800.000	1 – 200.000

Bảng 3: Thời gian cần thiết để làm trương nở gel Sephadex.

Loại gel	Thời gian cần để gel trương nở	
	Ở nhiệt độ phòng	Ở trên bếp cách thủy 100°C
G-10, G-15, G-25, G-50	3 giờ	1 giờ
G-75	24 giờ	3 giờ
G-100, G-150, G-200	3 ngày	5 giờ

2.1.2. Kỹ thuật sắc ký của gel Sephadex tùy vào dung môi sử dụng

Các loại gel Sephadex, nhất là loại gel có độ nối mạng cao như G-10, G-15 trương nở trong nước và cả trong dung môi hữu cơ như: dimetylformamid (DMF), dimetylsulfoxid (DMSO), etylen glycol, metanol-nước... nên gel thường được sử dụng để tách các hợp chất tự nhiên thuộc các loại hợp chất có thể tan trong nước như carbohydrat, peptid nhỏ.

Tùy vào dung môi giải ly, sắc ký gel có thể tách hợp chất theo hai kỹ thuật sắc ký khác nhau:

✳ *Khi giải ly cột với đơn dung môi*, gel Sephadex tách hợp chất bằng kỹ thuật sắc ký gel qua đó các hợp chất được tách nhờ vào sự khác biệt về trọng lượng phân tử.

✳ *Khi giải ly cột gel với hỗn hợp dung môi*, gel Sephadex sẽ tách hợp chất bằng kỹ thuật sắc ký phân chia, qua đó các hợp chất được tách riêng ra tuỳ vào ái lực của hợp chất đó đối với một trong hai pha lỏng trong cột.

Khi sử dụng hỗn hợp hai dung môi (tốt nhất là một dung môi phân cực và một dung môi có tính kém phân cực), gel Sephadex có ái lực mạnh với dung môi có tính phân cực mạnh hơn, đưa đến hệ quả tạo thành hai pha: pha động lỏng và pha tĩnh lỏng (xem lại chương sắc ký cột).

Các nghiên cứu cho thấy khi ngâm gel vào một lượng thừa butanol bão hòa nước, gel sẽ hút dung môi này và nhất là nước để trương nở đến một mức

độ nào đó. Như thế, bên trong hạt gel là nước bão hòa butanol và bên ngoài hạt gel là butanol bão hòa nước, sắc ký là sắc ký phân chia, các hợp chất phân bố với nồng độ khác nhau giữa hai pha lỏng này.

Bảng 4 trình bày một vài thí dụ về sắc ký phân chia sử dụng gel Sephadex, giải ly bằng hỗn hợp dung môi.

Bảng 4: Điều kiện thực nghiệm sắc ký phân chia áp dụng với gel Sephadex

Hợp chất cô lập	Loại gel	Kích thước cột (cm)	Hệ dung môi giải ly (v:v)
Các hormone peptid	G-25	4,5 x 65	AcOH băng: pyridin: nước (55:15:30)
Loại muối khỏi pept	G-25	4,5 x 55	AcOH băng: pyridin: nước (60:15:25)
Các oxytocin	G-25	2,2 x 115	*n*-Butanol: benzen: pyridin: 1% AcOH (6:2:1:9)
Các đường, đường amin	G-25	5-10 ml	*n*-Butanol: AcOH: nước (62:15:25)
Các amino acid	G-25	1,5 x 80	*n*-Butanol: AcOH: nước (4:1:1)
Các hợp chất loại oxytocin	G-25	2,2 x 120	*n*-Butanol: *n*-propanol: AcOH 0,2N (2:1:3)
Các protein bị thủy giải một phần	G-25	2,0 x 120	*n*-Butanol: *n*-propanol: (AcOH 3% + pyridin 3%) [2:1:3]
Các dipeptid	G-50	1,5 x 100	Pyridin: nước (1:1)
Các loại peptid	G-75	3,5 x 40	Phenol: AcOH băng: nước (1:1:1)

2.1.3. Thu hồi và tái sử dụng gel Sephadex

Sau quá trình thực nghiệm với các loại gel Sephadex, có thể thu hồi gel để tái sử dụng cho những lần sau. Khi không sử dụng nữa, tồn trữ gel bằng cách giữ nguyên gel trong cột, bịt chặt đầu cột và nhớ luôn có một lớp dung môi trên bề mặt lớp gel. Tuy nhiên để như thế, gel có thể bị hư hại bởi các loại vi sinh vật, có thể tránh bằng cách thêm dung dịch 0,02% azid natri vào dung môi giải ly cột lần cuối cùng. Tốt nhất vẫn là làm gel trở lại dạng hạt khô như ban đầu, bằng cách thao tác như sau.

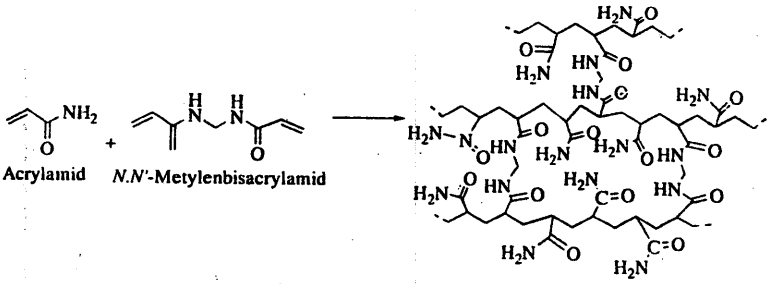
Cho gel vào phễu lọc xốp và rửa với thật nhiều nước để loại muối, tiếp theo rửa với etanol 50% để làm giảm thể tích hạt gel còn phân nửa. Để đuổi hết phần nước còn lại, cho hạt gel này vào etanol 99% với tỉ lệ thể tích gel: thể tích etanol là 1:2. Cho tiếp xúc 30 phút, thỉnh thoảng khuấy trộn nhẹ. Lọc, thu hồi gel. Ngâm vào etanol. Thực hiện như thế nhiều lần. Lọc, sấy gel ở 60-80°C, cho hạt gel khô, rời từng hạt. Nếu hạt gel không khô rời từng

hạt là do etanol chưa loại được hết phần nước trong hạt, cần tiếp tục quá trình vừa rồi.

Chú ý nếu nhiệt độ lên 120°C, hạt gel biến thành màu nâu (thay vì là màu trắng). Tuy nhiên, ở trạng thái trương nở, hạt gel có thể được tiệt trùng trong nồi hấp (autoclave) ở 110°C trong 40 phút, chất lượng hạt gel không thay đổi.

2.2. Gel polyacrylamid (Gel Bio-Gel loại P)

Nhà sản xuất Bio-Rad có bán loại gel polyacrylamid đặt tên là Bio-Gel P, một loại polymer tổng hợp dưới dạng hạt hình cầu, chế tạo từ acrylamid (CH_2=CH-$CONH_2$) với *N,N*-metylenbisacrylamid. Thay đổi tỉ lệ của hai cấu phần monomer nêu trên sẽ làm thay đổi kích thước của lỗ rỗng. Hạt gel có kích thước trung bình 45-180 μm.



Hình 3: Một phần cấu trúc của gel polyacrylamid

Bảng 5: Các loại gel polyamid Bio-Gel.

Loại gel	Lượng nước hấp thu (ml/g gel khô)	Thể tích hạt gel (ml/g)	Khả năng tách các hợp chất theo trọng lượng phân tử (M)
P-2	1,6	3,8	200 -2.000
P-4	2,6	6,1	500 – 4.000
P-6	3,2	7,4	1.000 – 5.000
P-10	5,1	12	5.000 – 17.000
P-30	6,2	14	20.000 – 50.000
P-60	6,8	18	30.000 – 70.000
P-100	7,5	22	40.000 – 100.000
P-150	9,0	27	50.000 – 150.000
P-200	13,5	47	80.000 – 300.000
P-300	22,0	70	100.000 – 400.000

Bio-gel tương đối trơ, nhưng kém bền hơn Sephadex; gel ổn định bền ở môi trường pH 2 – 11. Trong môi trường kiềm mạnh, nghĩa là có nồng độ HO^- cao, các nối amid bị thủy giải thành acid carboxylic –COOH, điều này khiến cho gel có tính chất phần nào giống như nhựa trao đổi ion, vì thế không nên sử dụng Bio-gel cho trường hợp sắc ký thực hiện thời gian dài, trong điều kiện pH < 9.

Bio-gel là nguyên liệu plastic nên khi tồn trữ lâu dài không bị các loại vi sinh vật làm hư hại như loại Sephadex.

Giống như gel dextran, gel polyacrylamid có tính chất ái nước cực mạnh (hydrophilic) nhờ các nhóm $-NH_2$. Hạt gel trương nở trong nước và muốn gel trương nở tốt, cần để hạt gel tiếp xúc với nước trong một khoảng thời gian: gel P-2 cần khoảng 30 phút, gel P-300 cần 24 giờ.

2.3. Gel styragel

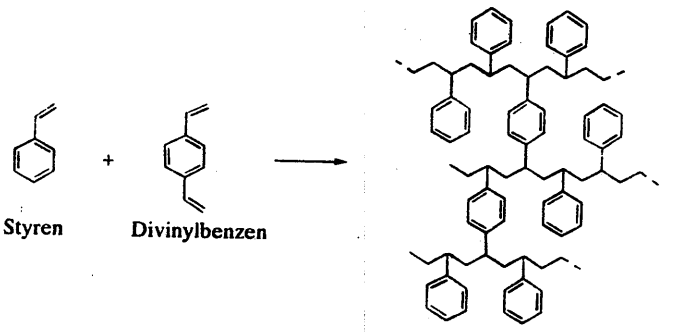
Bảng 6: Khoảng trọng lượng phân tử có thể phân tách bởi styragel.

Đường kính trung bình của lỗ rỗng hạt gel (Å)	Khoảng trọng lượng phân tử để tách các polymer vinyl	Trọng lượng phân tử bị gel đuổi ra khỏi cột
40	800	1.600
100	2.000	4.000
400	8.000	16.000
1.000	20.000	40.000
5.000	100.000	200.000
10.000	200.000	400.000
30.000	600.000	1.200.000
100.000	2.000.000	4.000.000
300.000	6.000.000	12.000.000
500.000	10.000.000	20.000.000
1.000.000	20.000.000	40.000.000

Nhà sản xuất cung cấp gel styragel ở dạng huyền phù trong dung môi dietylbenzen, không được để khô gel. Gel này là polymer được tổng hợp từ styren và divinylbenzen và hạt gel có đặc tính là không trương nở.

Với loại gel này, nên giải ly cột với các dung môi tetrahydrofuran, *o*-diclorobenzen, toluen, *m*-cresol, clorur metylen, dimetylformamid và

không nên sử dụng dung môi phân cực như nước, metanol, aceton, hoặc acid formic.



Hình 4: Một phần cấu trúc của Styragel

Hạt gel hình cầu, kích thước 40-80 µ. Bảng 6 trình bày một số gel loại styragel. Các hạt gel khác nhau bởi đường kính trung bình của lỗ rỗng, tính bằng Å.

3. CÁC NGUYÊN TẮC CĂN BẢN VỀ THỰC HÀNH SẮC KÝ GEL

Sắc ký gel phải thực hiện trong cột hình ống trụ bằng thủy tinh.

3.1. Nhồi gel vào cột

Cột sử dụng cho sắc ký gel cũng giống như cột sắc ký cổ điển, là cột bằng thủy tinh.

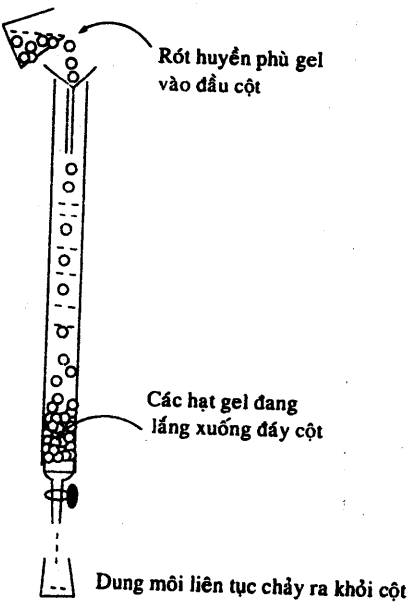
Các hạt gel trương nở hiện diện ở dạng huyền phù trong dung môi phù hợp được cho vào cột theo *kỹ thuật nhồi cột sệt* (giống như sắc ký cột cổ điển). Huyền phù được chỉnh sao cho thật sệt nhưng khi rót vào cột vẫn chảy thành dòng dễ dàng.

* Sau khi rót huyền phù gel vào cột, cân bằng cột bằng cách cho dung môi giải ly (loại khởi đầu cho việc giải ly) chảy ngang qua cột, lượng dung môi có thể tích bằng 2-3 lần thể tích cột. Vận tốc dòng chảy có thể nhanh hơn một ít so với lúc thực nghiệm thực sự để tách chất.

* Kiểm tra sự chặt chẽ của cột bằng cách cho một lượng mẫu thử vào đầu cột. Mẫu thử thường được chọn là dextran blue 2000, có màu xanh

dương, để có thể quan sát bằng mắt thường sự di chuyển của mẫu trong cột. Thể tích dung dịch mẫu < 10% thể tích cột. Cho dung môi giải ly để đuổi hoàn toàn lượng mẫu thử này ra khỏi cột.

Nếu cột gel được nạp chặt chẽ, mẫu thử ra khỏi cột bằng một dãy băng nằm ngang ngay ngắn, dãy hẹp. Cách thử này cũng giúp biết được thể tích trống V_o của cột: là thể tích dung môi cần thiết để đuổi một hợp chất màu, có trọng lượng phân tử lớn nên không lọt được vào lỗ rỗng của hạt gel mà ra ngay khỏi cột.



Hình 5: Thực hiện nạp gel trương nở vào cột (kỹ thuật nạp cột sệt)

Thể tích trống V_o cho biết các hợp chất nào ra ngay khỏi cột ở giai đoạn này là hợp chất có trọng lượng phân tử lớn hơn khả năng tách chất của hạt gel được chọn để thực nghiệm.

✳ Trong suốt quá trình nạp gel cũng như triển khai sắc ký, không được để khô lớp mặt gel trên đầu cột.

3.2. Đặt mẫu cần sắc ký lên đầu cột gel

Dung dịch mẫu cần tách phải được lọc bỏ những hợp chất còn ở dạng rắn, cặn. Dung dịch mẫu được hòa tan vào dung dịch đệm, đặt lên đầu cột giống như trong thực hành với sắc ký cột cổ điển.

Có tỉ lệ tương đối giữa thể tích dung dịch mẫu nạp lên đầu cột và thể tích V_t của cột gel. Gọi V_{e1} và V_{e2} là thể tích dung môi cần thiết để lần lượt giải ly hai hợp chất có đặc điểm gần giống nhau nhất.

• Với những loại mẫu chất mà ($V_{e1} - V_{e2}$) có giá trị lớn, thể tích dung dịch mẫu có thể chiếm 10-30% tổng thể tích V_t của cột gel.

• Với những loại mẫu chất mà (V_{e1} – V_{e2}) có giá trị nhỏ, thể tích dung dịch mẫu chỉ nên là 1 - 3% tổng thể tích V_t của cột gel.

Khối lượng mẫu và nồng độ của những chất tan trong mẫu chỉ quan trọng khi chúng có thể gây ảnh hưởng lên độ nhớt của dung dịch mẫu. Độ nhớt của dung dịch mẫu cao gấp > 2 độ nhớt của dung môi giải ly có thể ảnh hưởng đến kết quả tách chất.

3.3. Triển khai sắc ký gel

Triển khai giải ly rất đơn giản, chỉ sử dụng kỹ thuật dung môi đơn nồng độ. Giải ly có thể bằng trọng lực nhưng tốt nhất là sử dụng bơm đẩy từ đầu cột. Hứng dung môi giải ly trong những lọ nhỏ, mỗi lọ có một thể tích nhất định. Các chất tan sẽ ra khỏi cột theo thứ tự trọng lượng phân tử giảm dần.

3.4. Thí dụ cụ thể về sắc ký gel Sephadex LH-20

Gel Sephadex LH-20 là gel Sephadex G-25 đã được hydroxylpropyl hóa nghĩa là biến đổi một số nhóm –OH trong gel dextran thành nhóm –O-CH_2-CH_2-CH_2-OH. Việc điều chế dẫn xuất này giúp cho gel có thêm tính thân dầu (lipophilicity) bên cạnh tính ái nước (hydrophilicity) sẵn có.

Bên cạnh việc gel trương nở trong nước, gel có thể trương nở trong dung môi hữu cơ có tính phân cực như dimetylsulfoxid, pyridin, dimetylformamid, metanol, tetrahydrofuran... (trong dung môi hữu cơ, gel nở khoảng gấp 4 lần thể tích lúc khô).

Bảng 7 cho biết lượng dung môi có thể hấp thu bởi gel Sephadex LH-20.

Nhờ khả năng gel có thể trương nở trong dung môi hữu cơ phân cực, gel Sephadex LH-20 được dùng trong việc tách các hợp chất thiên nhiên, loại tan trong dung môi hữu cơ.

Gel Sephadex LH-20 tách hợp chất theo hai kỹ thuật sắc ký khác nhau tùy vào dung môi giải ly.

* *Khi giải ly cột với đơn dung môi*, gel Sephadex LH-20 tách hợp chất bằng kỹ thuật sắc ký gel nhờ vào sự khác biệt về trọng lượng phân tử. Các

hợp chất có trọng lượng phân tử khoảng 4.000 dalton thường không bị giữ trong gel Sephadex LH-20 nên được giải ly ra khỏi cột ngay trong thể tích trống của cột. Khả năng gel tách các hợp chất theo trọng lượng phân tử khoảng 100 - 4.000.

✳ *Khi giải ly cột gel với hỗn hợp dung môi,* gel Sephadex LH-20 tách hợp chất bằng kỹ thuật sắc ký phân chia, các hợp chất được tách riêng ra tuỳ vào ái lực của hợp chất đó đối với một trong hai pha lỏng trong cột.

Khi sử dụng hỗn hợp hai dung môi (tốt nhất là một dung môi phân cực và một dung môi có tính kém phân cực), gel Sephadex LH-20 có ái lực mạnh với dung môi có tính phân cực mạnh hơn, đưa đến hệ quả tạo thành hai pha: pha động lỏng và pha tĩnh lỏng (xem lại chương sắc ký cột).

Bảng 7: Lượng dung môi hữu cơ gel Sephadex LH-20 có thể hấp thu.

Dung môi	Lượng dung môi hấp thu (ml/g gel khô)	Thể tích hạt gel (ml/g)
Dimetylformamid	2,2	4,0 – 4,5
Nước	2,1	4,0 – 4,5
Metanol	1,9	4,0 – 4,5
Etanol	1,8	3,5 – 4,5
Cloroform (1% metanol)	1,8	3,5 – 4,5
Cloroform	1,6	3,0 – 3,5
n-Butanol	1,6	3,0 – 3,5
Tetrahydrofuran	1,4	3,0 – 3,5
Aceton	0,8	-
Etyl acetat	0,4	-
Toluen	0,2	-

3.4.1. Kích cỡ cột

Thường chọn cột bằng thủy tinh, có chiều dài khoảng 40 -100 cm, đường kính cột 1,5 - 2,5 cm. Kích thước cột được chọn tùy theo thể tích gel sử dụng.

3.4.2. Lượng mẫu phân tích và lượng gel

Trong thực nghiệm, sắc ký đạt kết quả tốt khi sử dụng 1 mg mẫu chất cần 1 ml gel đã trương nở.

3.4.3. Làm trương nở gel

Trong một becher hoặc một erlen, cho gel khô Sephadex LH-20 vào, thêm vào cột loại dung môi sẽ thực hiện sắc ký, dựa vào bảng 7 để tính toán lượng thể tích hơi thừa một ít. Tính toán để sử dụng lượng gel hơi thừa một ít đủ để nhồi vào cột. Để yên qua đêm để gel trương nở.

Gel Sephadex LH-20 có thể trương nở trong nhiều loại dung môi hữu cơ. Nhờ khả năng này, gel Sephadex LH-20 thường được dùng trong việc tách các hợp chất thiên nhiên nhiên, loại tan được trong dung môi hữu cơ.

3.4.4. Nạp gel vào cột

Cột được bắt thẳng đứng trên một cái giá. Mở van khoá ở bên dưới, mở một phần, rót dung dịch huyền phù gel vào cột. Đồng thời ở bên dưới có dung môi chảy ra. Rót dung dịch gel vào cột chảy thành một dòng nhỏ đều, chầm chậm sao cho chỉ rót một lần mà đầy cột. Tránh rót gel thành nhiều đợt, sẽ làm lớp gel nén không đều trong cột. Khỏ nhẹ bên ngoài thành cột để giúp gel nén đều.

3.4.5. Cân bằng gel trong cột

Sau khi gel được nạp hoàn tất vào cột, tiếp tục cho dung môi chảy ngang qua cột với vận tốc 1-5 ml/phút trong vài giờ để cột được nén đều. Lưu ý là phải luôn luôn có dung môi ở trên đầu cột, không được để gel trên mặt cột bị khô.

3.4.6. Lượng dung môi cần để hòa tan mẫu

Mẫu được hòa tan trong dung môi phù hợp.

* Nếu mục đích là loại bỏ muối (NaCl...), lượng dung dịch mẫu nạp trên đầu cột có thể chiếm khoảng 30 % thể tích cột gel.

* Nếu mục đích sắc ký gel là tách riêng các hợp chất, lượng dung môi dùng để hòa tan mẫu phải vào khoảng 1-5% thể tích cột gel. Thí dụ cột chứa 200 ml gel trương nở, sử dụng lượng dung môi để hòa tan mẫu tối đa là 10 ml. Dung dịch mẫu có nồng độ càng đậm đặc càng tốt vì như thế mới nằm thành một lớp mỏng trên đầu cột.

3.4.7. Nạp mẫu cần sắc ký lên đầu cột

Thực hiện như nạp mẫu ướt trong sắc ký cột cổ điển.

* Mở khoá cho dung môi chảy ra khỏi cột, để hạ mức dung môi trong cột xuống sao cho vừa sát với mặt thoáng của chất hấp thu trong cột. *Mặt thoáng của chất hấp thu lúc này phải nằm ngang đều.*

* Đóng khoá lại, nạp dung dịch mẫu vào đầu cột. Muốn nạp mẫu, sử dụng một pipette để hút dung dịch mẫu chất, đặt đầu của pipette gần sát với mặt thoáng của chất hấp thu trong cột, vừa bóp vừa rây pipette dọc quanh thành trong của cột, cho dung dịch chất chảy ra dọc theo thành trong của cột, chạm xuống bề mặt của chất hấp thu.

* Mở khóa bên dưới cho dung môi chảy ra khỏi cột, làm cho dung dịch mẫu được thấm hết vào chất hấp thu trên đầu cột, cần canh chừng không cho chất hấp thu ở đầu cột bị khô.

* Dùng pipette cho một lượng nhỏ *dung môi mới* lên đầu cột, tranh thủ dùng dung môi này để rửa sạch thành ống mà dung dịch mẫu chất đã trây dính trên thành cột. Lại mở khóa, cho dung môi chảy ra. Lặp lại vài lần việc rửa thành cột như thế để giúp cho dung dịch mẫu chất thấm sâu vào phần chất hấp thu ở phần đầu cột. Lặp lại như thế cho đến khi cho một ít dung môi lên đầu cột, dung môi sẽ trong suốt không màu (không bị lây màu của chất mẫu).

* Cho một lớp cát dầy khoảng 3-6 mm đặt nhẹ lên trên mặt thoáng của chất hấp thu để bảo vệ mặt cột. Nếu không có cát, có thể sử dụng bông thủy tinh, bông gòn, giấy lọc có đường kính vừa bằng với đường kính trong của cột. Cẩn thận để không làm xáo trộn bề mặt đang nằm ngay ngắn.

* Cuối cùng, cho dung môi vào đầy cột để bắt đầu quá trình giải ly.

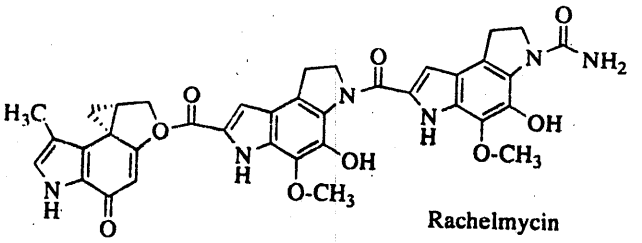
3.4.8. Giải ly cột

Trong sắc ký gel chỉ sử dụng kỹ thuật giải ly với dung môi đơn nồng độ, nghĩa là sử dụng một loại dung môi hoặc sử dụng hỗn hợp hai dung môi, với tỉ lệ x:y. Khi bắt đầu cho đến khi kết thúc quá trình giải ly, chỉ sử dụng đúng loại dung môi đó.

Có thể giải ly nhờ vào trọng lực với vận tốc dòng chảy 2-4 ml/phút (cho cột gel 200 ml). Có thể sử dụng một bơm nhẹ.

Thu dung dịch giải ly trong các lọ nhỏ. Thường hứng 2 lần thể tích cột gel.

Lưu ý khi thực nghiệm với gel Sephadex LH-20, việc tách có thể theo sắc ký gel, cũng có thể theo các cơ chế khác: hấp thu, phân chia, cũng có thể theo cơ chế trao đổi ion, vì thế trong quá trình thực nghiệm, đôi khi đã gặp trường hợp đão ngược, nghĩa là chất nhỏ ra khỏi cột trước và chất to ra khỏi cột sau. Vì thế, nếu hợp chất cần khảo sát không ra khỏi cột sau khi đã giải ly bằng lượng dung môi 2 lần thể tích cột, vẫn phải tiếp tục giải ly (cũng chỉ với đơn dung môi), đến 7-8 lần thể tích cột, lúc đó, hợp chất cô lập được sẽ khá tinh khiết.



Rachelmycin

3.4.9. Áp dụng cụ thể

Cô lập hợp chất kháng sinh rachelmycin.

Sử dụng etyl acetat để chiết dung dịch nước lên men. Cô đặc và đuổi dung môi đến khô, thu được một chất dầu (380 mg). Chất dầu này được hòa tan vào metanol (10 ml) và nạp lên đầu cột Sephadex LH-20 (400 ml thể tích gel). Cột được giải ly bằng metanol, vận tốc dòng chảy 20 ml/phút. Hứng dung môi giải ly trong các lọ, mỗi lọ 20 ml. Hứng 160 lọ.

Các lọ được thử nghiệm hoạt tính sinh học và nhận thấy lọ 93-135 có hoạt tính.

4. SẮC KÝ LỚP MỎNG VỚI KỸ THUẬT SẮC KÝ GEL

Có thể thực hiện sắc ký gel áp dụng trên tấm sắc ký lớp mỏng. Có nhiều tác giả đã thực hiện với các chi tiết được trình bày trong bảng 8.

4.1. Kích thước tấm bản gel

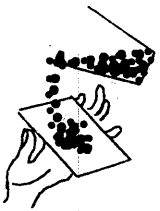
Bản mỏng là tấm kiếng giống như sắc ký lớp mỏng thông thường. Bản cần phải được rửa thật sạch, không được còn vết dầu mỡ. Muốn vậy, sau khi rửa sạch bản, cần giữ bản trong một dung dịch đậm đặc carbonat natri và trước khi tráng, vớt bản ra và rửa bản thật kỹ với nước cất.

4.2. Lượng gel cần để tráng bản

Chọn gel Sephadex loại mịn, khô (bảng 2), cho trương nở trong dung môi theo thời gian qui định (bảng 3). Khi nào muốn tráng lên tấm bản mỏng, gạn bỏ bớt dung môi để có dung dịch gel sệt và tráng lên tấm bản mỏng. Một vài tác giả sử dụng lượng dung môi vừa đủ để có dung dịch gel sệt và tráng ngay lên tấm bản mỏng, cách làm như thế dễ gặp sự vón cục, bản tráng không được đều.

Muốn tráng một bản gel có kích thước 10x20 cm, chiều dầy gel 0,9 mm, cần 1 g gel Sephadex G-100 hoặc 0,66 g Sephadex G-200. Muốn tráng một bản gel có kích thước 20x20 cm, chiều dầy gel 0,5 mm, cần 1,5 g gel Sephadex G-200.

Có thể tráng bản bằng cách trải, sử dụng máy bán thủ công hoặc bằng cách rót thủ công. Bản sau khi được tráng xong, được đặt trên một mặt phẳng nằm ngang, để yên qua đêm, trong bầu không khí ẩm. Thí dụ đặt bản trong một bình hút ẩm có chứa sẵn một tấm giấy lọc ướt đẫm nước, như thế bản sẽ được đồng nhất.



Hình 6: Tráng bản mỏng bằng phương pháp rót

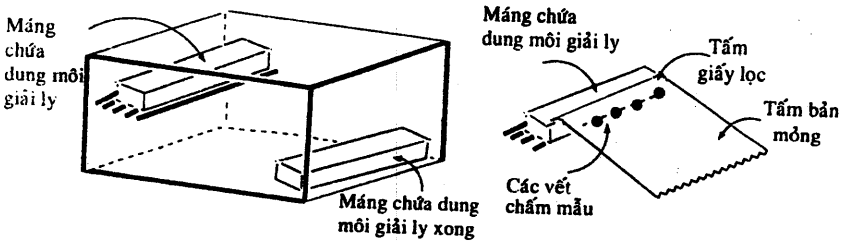
Có tác giả thực hiện độ ẩm bão hòa cho bản bằng cách chứa bản trong bình ẩm trong 1-3 tuần. Có tác giả cho dung môi giải ly chảy ngang qua bản một lần trước khi đặt mẫu phân tích lên mức xuất phát của bản.

Bảng 8: Sắc ký gel áp dụng trên tấm sắc ký lớp mỏng.

Tên tác giả	Johanson	Andrew	Morris	Determan
Loại gel	G-25mịn, G-50 mịn, G-75 cực mịn, G-200 cực mịn	G-100 cực mịn	G-100 cực mịn G-200 cực mịn	G-200 cực mịn
Kích thước tấm bản mỏng (cm)	20 x 40 20 x 50	10 x 20	10 x 20	20 x 20 20 x 40
Bề dầy lớp gel (mm)	0,5	0,5	0,9	0,5
Bình giải ly	Bình ẩm	Nghiêng 10 -20°	Bình ẩm	Bình sandwich nghiêng 10 -20°
Bước chuẩn bị	Trước tiên, tấm bản được rửa giải trong 1 giờ	Trước tiên tấm bản được rửa giải trong nhiều giờ	Để bản nằm ngang trong 18 giờ	Để bản nằm ngang trong 24 giờ
Thời gian triển khai một mẫu	1-2 cm/giờ	8 -10 giờ	4 -5 giờ	2 - 6 giờ
Áp dụng	Protein trong huyết tương	Xác định trọng lượng phân tử của các protein	Xác định trọng lượng phân tử của protein	Protein

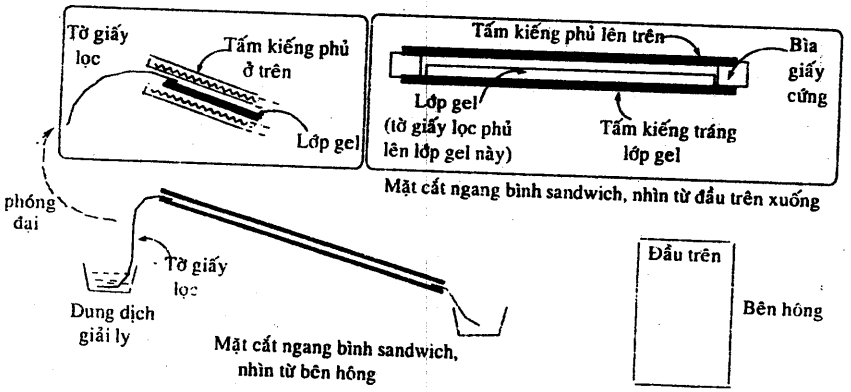
4.3. Phương pháp triển khai bản mỏng

Tấm lớp mỏng được đặt nằm nghiêng (độ dốc khoảng 10 - 40°) để cho dung môi giải ly chảy ngang qua chầm chậm và sao cho bản không bị khô trong quá trình giải ly, vì phải tốn nhiều giờ mới giải ly hoàn tất một bản. Dung môi giải ly chảy ngang qua bản và sau đó được loại bỏ, hai việc này phải xảy ra cùng lúc. Thông thường, các phòng thí nghiệm thực hiện sắc ký bản mỏng gel trong một bình khá lớn.



Hình 7: Bình giải ly cho sắc ký lớp mỏng gel

Để tránh sử dụng bình lớn, nhưng vẫn thực hiện nhanh chóng và cho kết quả thành công, có tác giả đã cải tiến dùng bình sandwich như hình 8. Phủ lên trên bề mặt bản gel là một tấm kiếng có cùng kích thước, tấm kiếng này cách bề mặt bản gel một khoảng cách ngắn nhờ vào 2 tấm giấy bìa cứng đặt xuôi theo hai bên bờ cạnh dài của bản gel. Hai tấm kiếng được giữ lại với nhau bằng hai cái kẹp lớn kẹp hai bên cạnh. Bản gel được nối với lọ chứa dung môi giải ly nhờ vào một tờ giấy lọc. Tờ giấy lọc này có bề ngang bằng với chiều ngang của bản gel, như trình bày trong hình 8.



Hình 8: Bình triển khai bản mỏng gel loại sandwich

5. CÁC ỨNG DỤNG CỦA SẮC KÝ GEL

5.1. Để xác định trọng lượng phân tử của một hợp chất đại-phân tử

Trọng lượng phân tử của một hợp chất đại phân tử có thể được xác định bằng nhiều phương pháp khác nhau như: khối phổ (mass spectroscopy), điện di (electrophoresis), sắc ký gel...

Đầu tiên, sắc ký gel được dùng để tách các đại phân tử có nguồn gốc sinh học như protein, polysacarid, acid nucleic, enzym... và các quan sát nhận thấy rằng các hợp chất bị giải ly ra khỏi cột theo thứ tự trọng lượng phân tử giảm dần. Người ta đã ứng dụng việc này vào việc ước đoán trọng lượng phân tử của một hợp chất chưa biết.

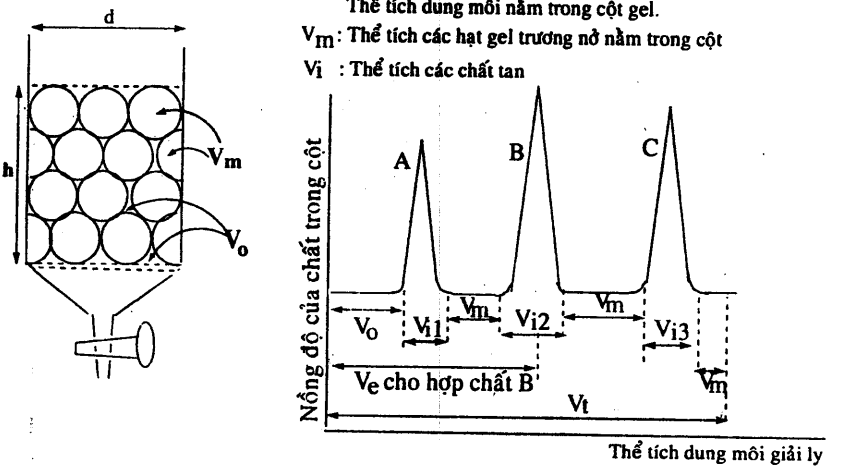
$$V_t = V_o + V_i + V_m = \frac{p\,d^2}{4} h$$

V_t : Tổng thể tích cột gel, có thể đo được (bed volume)

V_O : Thể tích trống, thể tích chết (Void volume, dead volume) Thể tích dung môi nằm trong cột gel.

V_m : Thể tích các hạt gel trương nở nằm trong cột

V_i : Thể tích các chất tan



Hình 9: Các tham số tách trong sắc ký gel

Hạt gel trương nở chiếm một thể tích trong cột và có định nghĩa về các loại thể tích như trình bày trong hình 9. Có thể đo được một số loại thể tích nói trên.

- V_t: Toàn thể phần thể tích ở bên trong cột sắc ký gel.
- V_o : Đo được bằng cách sử dụng một chất chuẩn, là bất kỳ hợp chất đại phân tử nào nếu có trọng lượng phân tử lớn hơn nhiều so với lỗ trống của hạt gel đang sử dụng, nên không thể chui vào lỗ trống hạt gel và sẽ bị giải ly ngay ra khỏi cột gel. Khi giải ly với dung dịch nước, người ta thường chọn một polysacarid đã được nhuộm màu là Dextran Bleu (hãng Pharmacia).
- V_i và V_m : khó đo được.

Bảng 9 cho biết một vài số liệu thể tích của sắc ký gel. Các loại gel có khả năng cho lỗ rỗng lớn, sẽ trương nở nhiều, nên khoảng trống chứa dung môi cũng nhiều, hệ quả là tỉ trọng (d= g/ml) của hạt gel sẽ nhỏ; ngược lại, các loại gel có cho lỗ rỗng bé, trương nở ít sẽ có tỉ trọng của hạt gel lớn.

Trên cùng một cột gel, thể tích dung môi cần thiết để giải ly một hợp chất cụ thể sẽ là một giá trị không đổi và tùy thuộc vào kích thước của phân tử đó. Từ đó, người ta sử dụng thể tích giải ly để dự đoán trọng lượng phân tử của một hợp chất. Để thực hiện, cần phải thiết lập đường biểu diễn chuẩn cho biết mối liên quan giữa thể tích dung môi giải ly và trọng lượng phân tử của hợp chất.

Bảng 9: Thể tích tương đối của 1 gam gel khô Sephadex trương nở trong nước.

Gel	Thể tích tổng V_t (ml)	Thể tích chết V_o (ml)	Thể tích của hạt gel $V_{(m-o)}$ (ml)	Tỉ trọng của hạt gel trương nở (d; g/ml)
G-10	2	0,8	1,0	1,24
G-15	3	1,1	1,5	1,19
G-25	5	2	2,5	1,13
G-50	10	4	5	1,07
G-75	13	5	7	1,05
G-100	17	6	10	1,04
G-150	24	8	15	1,03
G-200	30	9	20	1,02

Bảng 10: Các polystyren tổng hợp thương mại được sử dụng làm chất chuẩn để thiết lập đường chuẩn đo trọng lượng phân tử.

N	Trọng lượng phân tử trung bình (Mw)
1	900
2	2.000
3	2.030
4	3.600
5	4.800
6	5.000
7	10.000
8	10.300
9	19.800

N	Trọng lượng phân tử trung bình (Mw)
10	19.900
11	51.000
12	97.200
13	160.000
14	173.000
15	411.000
16	867.000
17	1.800.000
18	2.145.000

Do các hợp chất đại phân tử có hình dạng cấu trúc trong không gian ba chiều khá khác nhau, vì thế, khi muốn thiết lập đường chuẩn để đo trọng lượng phân tử của một hợp chất, cần lựa chọn các chất chuẩn càng tương đồng với chất cần khảo sát, càng cho kết quả tốt. Nhưng không dễ tìm được các hợp chất chuẩn có cấu trúc tương đồng với chất cần khảo sát. Người ta thường chọn mẫu chuẩn là một trong hai loại như sau, hoặc là các polystyren tổng hợp thương mại, như trình bày trong bảng 10 hoặc là các protein như trong bảng 11 và 12.

Bảng 11: Các protein thương mại được sử dụng làm chất chuẩn để thiết lập đường chuẩn đo trọng lượng phân tử.

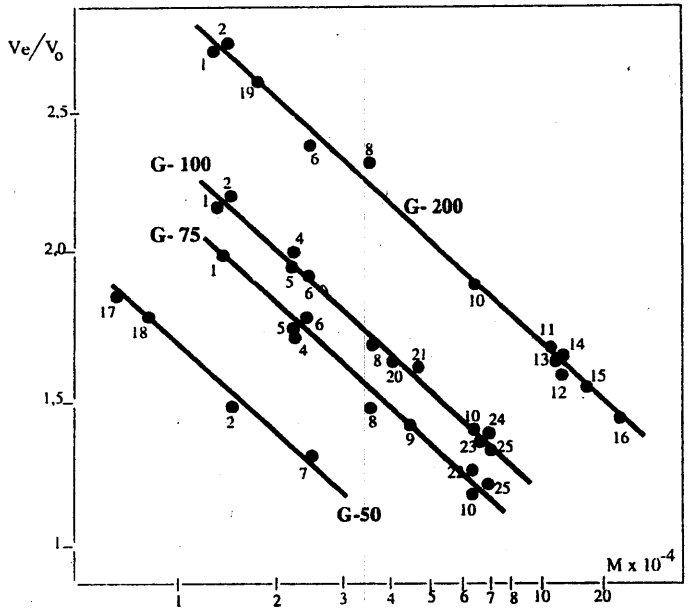
N	Protein	Trọng lượng phân tử
1	Cytochrom c	13.000
2	Ribonuclease A	13.600
3	Myoglobin	17.800
4	Chất ức chế trypsin (soja)	21.500
5	α-Chymotrypsin	22.500
6	Trypsin	24.000
7	Chymotrypsinogen A	25.000

8	Pepsin	35.500
9	Ovalbumin	45.000
10	Serumalbumin (monomer, bovine)	67.000
11	Deshydrogenase của phosphat aldehyd glyceric	117.000
12	Serumalbumin (monomer, bovine)	134.000
13	γ-Globulin (người)	140.000
14	Aldose (men)	147.000
15	Alcol deshydrogenase (men)	150.000
16	Catalase	230.000

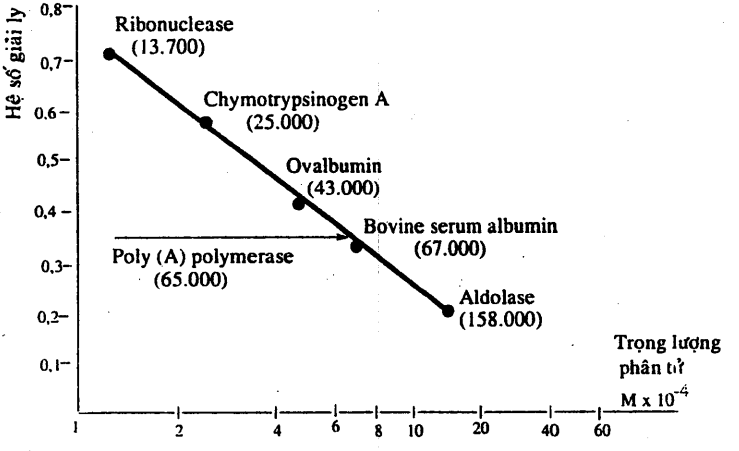
Bảng 12: Các protein thương mại được sử dụng làm chất chuẩn thiết lập đường chuẩn để đo trọng lượng phân tử.

N	Protein	Trọng lượng phân tử
17	Chất ức chế callicreine	6.500
18	Chất ức chế trypsin	8.400
19	Methemoglobin	17.000
20	Peroxydase-1	40.000
21	α-Hydroxysteroiedeshydrogenase	47.000
22	Phosphoglyceromutase	64.000
23	Malate deshydrogenase	79.000
24	Enolase	80.000
25	Creatine phosphokinase	81.000
26	Pyruvate kinase	230.000
27	Xanthine oxydase	320.000

Hình 10 là đường biểu diễn sự thay đổi thể tích dung dịch giải ly tùy theo trọng lượng phân tử của một số protein chuẩn, có bán sẵn, sử dụng các loại gel Sephadex khác nhau.



Hình 10: Sự thay đổi thể tích dung dịch giải ly theo trọng lượng phân tử của các loại protein trong bảng 11 và 12 áp dụng trên các loại gel Sephadex khác nhau.



Hình 11: Đường biểu diễn mối liên quan giữa trọng lượng phân tử trong bộ mẫu chuẩn và thể tích giải ly ra khỏi cột gel Sephacryl S-200 (2,0 x 70cm), để ước lượng trọng lượng phân tử của hợp chất Poly (A) polymerase

Thực hành: Cột gel được lần lượt sắc ký (trong cùng điều kiện) với các chất chuẩn có trọng lượng phân tử biết trước. Vẽ đường biểu diễn mối liên quan giữa thể tích dung môi giải ly và trọng lượng phân tử của hợp chất. Tiếp theo, với một hợp chất cần biết trọng lượng phân tử, nạp vào đầu cột, sử dụng cùng điều kiện giải ly để biết thể tích dung dịch đã giải ly chất ra khỏi cột. Sử dụng đường biểu diễn chuẩn để suy ra trọng lượng phân tử của chất.

5.2. Để tách một hỗn hợp nhiều chất thành các nhóm hợp chất riêng rẽ

Áp dụng đơn giản nhất của sắc ký gel là tách một hỗn hợp thành hai nhóm hợp chất có kích thước khác xa nhau. Nếu chọn được một gel thích hợp, hợp chất có trọng lượng phân tử lớn sẽ bị đuổi hoàn toàn ra khỏi cột gel, thường thì bị đuổi ra ngay từ thể tích trống V_o, còn hợp chất có trọng lượng phân tử nhỏ sẽ lọt vào lỗ trống của hạt gel, lọt toàn phần hoặc một phần, sẽ ra khỏi cột sau.

Áp dụng cao hơn là muốn cô lập một nhóm hợp chất có trọng lượng phân tử nằm trong một khoảng xác định. Muốn vậy, phải sử dụng lần lượt nhiều cột gel với loại gel khác nhau.

Thí dụ các nghiên cứu trước cho biết hỗn hợp khảo sát gồm nhiều protein hình cầu có trọng lượng phân tử lớn, nhỏ khác nhau, nhưng chỉ muốn thu lấy phân đoạn chứa protein có trọng lượng phân tử khoảng 50.000 dalton. Để đạt được điều này, thực hiện sắc ký gel với gel Sephadex G-75 nhằm loại bỏ những protein có trọng lượng phân tử > 50.000 D. Dung dịch giải ly được tiếp tục sắc ký trên gel Sephadex G-50 để loại những protein có trọng lượng phân tử < 50.000 D.

5.3. Để loại bỏ muối ra khỏi một hợp chất hoặc dung dịch

Trong các qui trình tinh chế các hợp chất có tính kháng sinh, người ta thường sử dụng sắc ký trao đổi ion, giải ly cột bằng dung dịch đệm có pha thêm 1% NaCl, như thế, dung dịch giải ly hứng được sẽ chứa vừa hợp chất hữu cơ cần tinh chế và muối NaCl. Tiếp theo, các dung dịch giải ly này sẽ được loại muối bằng phương pháp sắc ký gel để thu được hợp chất hữu cơ.

Để loại bỏ muối, người ta thường sử dụng các loại gel như: Sephadex G-10, Sephadex G-15, Sephadex LH-20, Biogel P-2..... Khi thực hiện sắc ký gel với các loại gel này, hợp chất hữu cơ có kích thước to sẽ ra khỏi cột trước, còn các ion vô cơ có kích thước nhỏ, bị giữ mạnh trong hạt gel và sẽ bị đuổi ra khỏi cột sau.

Một thí dụ cụ thể để minh họa.

i) Một dung dịch 10 ml vừa được giải ly ra khỏi cột sắc ký trao đổi ion và được đông khô chân không, thu được bột khô. Bột khô này được hòa tan trở lại trong 1 ml nước và đặt lên đầu một cột gel Biogel P-2, chứa 80 ml gel trong một cột có kích thước: bán kính trong của cột 1,5cm, chiều dài cột 45 cm.

ii) Giải ly cột bằng nước cất, với vận tốc dòng chảy 0,8 ml/phút. Hứng dung dịch giải ly trong các lọ nhỏ, mỗi lọ 2 ml (mỗi lọ tốn 2,5 phút).

iii) Để phát hiện ion clorur: với mỗi lọ, lấy riêng 20 µl dung dịch, cho vào các ống nghiệm nhỏ, thêm vào mỗi ống này 100 µl dung dịch nước nitrat bạc 1% (dung dịch cần phải có tính acid).

iv) Mỗi lọ đều được thử nghiệm hoạt tính sinh học tính kháng khuẩn.

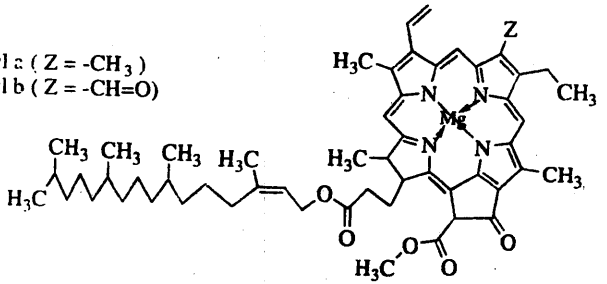
v) Kết quả: các lọ 27-28 có tính kháng khuẩn; lọ 32-33 có NaCl.

5.4. Để loại bỏ các chất màu tạp bẩn ra khỏi hợp chất đang khảo sát

Trong ngành hóa học các hợp chất thiên nhiên, trong quá trình cô lập các hợp chất hữu cơ từ cây cỏ, các dung dịch chiết thường có màu xanh lục đậm là do có chứa các diệp lục tố (chlorophyl a và b). Nếu hợp chất khảo sát có trọng lượng phân tử nhỏ (M< 700) có thể tinh chế hợp chất này bằng sắc ký gel với cột nhồi gel Sephadex G-10, G-25, Biogel P-2; P-4 (Nhắc lại: Sephadex G-10 có khoảng tách chất từ 0 -700 Dalton).

Clorophyl a có công thức phân tử $C_{55}H_{72}MgN_4O_5$ với M = 893,48, không tan trong eter dầu hỏa, tan tốt trong eter dietyl, benzen, cloroform, aceton, etanol và clorophyl b có trọng lượng phân tử M = 907,46, tan kém trong eter dầu hỏa, tan tốt trong aceton, etanol.

Clorophyl a (Z = -CH_3)
Clorophyl b (Z = -CH=O)



Khi cho phân đoạn cao chiết có chứa các clorophyl và hợp chất hữu cơ lên đầu cột gel, sử dụng đơn dung môi để giải ly (cloroform, aceton hoặc metanol tùy vào hợp chất có tính phân cực hay không), các diệp lục tố sẽ ra khỏi cột ngay trong thể tích trống của cột, còn các hợp chất hữu cơ có trọng lượng phân tử nhỏ sẽ chui vào hạt gel nên sẽ ra khỏi cột sau, qua đó tách bỏ được các chất màu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. **A. Braithwaite, F.J. Smith**. *Chromatographic methods*. Kluwer Açademic Publishers. Boston-London, 45-501, 1999.

[2]. **David Sheehan**. *Physical biochemistry: principles and applications*. John Wiley and Sons, LTD. New York, Singapore, Toronto. 30-35. 2000

[3]. **E. Heftmann**. *Journal of chromatography library*. Vol 51 A. Elsevier. Oxford. Tokyo. A268-A297, 1992.

[4]. **Helmut Determan**. *Chromatographie sur gel*. Manuel de laboratoire. Masson et C^{ie} Éditeur, 26-101, 1969.

[5]. **Richard J.P. Cannell**. *Natural Products Isolation*. Humana Press, Totowa- New Jersey, 20-212, 1998.

Bảng 1a: Một số loại gel thương mại sử dụng cho sắc ký gel

Tên gel	Loại gel	Cấu trúc	Dung môi (pha động)	M_r	Kích thước hạt gel (µm)	Ghi chú
Sephadex G	Xerogel	Dextran	Nước	6×10^5	10-40; 40-120; 50-150; 100-200	Hạt cực mịn, tách tốt
Sephadex LH	Xerogel	Dextran hydroxylpropyl eter	Hữu cơ phân cực	5×10^3	25 - 100	Đuổi có giới hạn, tùy theo dung môi
Bio-Gel P	Xerogel	Polyamid	Nước	4×10^3	50-100; 100-200; 200-400	
Enzacryl Gel K	Xerogel	Polyacryloylmorpholine	Nước; Hữu cơ phân cực	1×10^5	-	Trương nở chút ít trong alcol dây ngắn.
Bio-Beads SX	Pha trộn	Polystyren	Hữu cơ	14×10^3	-	-
Styragel	Pha trộn	Polystyren lỗ rỗng to	Hữu cơ kém phân cực	4×10^8		
Bio-Gel A	Pha trộn	Agarose	Nước	4×10^7	50-100; 100-200; 200-400	
Sepharose	Pha trộn	Agarose	Nước	4×10^7	60-250; 40-190; 40-210	
Merck-O-Gel	Pha trộn	Acetat polyvinyl	Hữu cơ phân cực	1×10^6		
Porasil	Aerogel	Silica	Nước; Hữu cơ	2×10^4		
Bio-Glas	Aerogel	Thủy tinh	Nước; Hữu cơ	9×10^4		

Bảng 1b: Một số loại gel với tên thương mại, khả năng tách và các ứng dụng.

Loại gel	Khoảng trọng lượng phân tử (cho các protein hình cầu) Kilo Dalton (KDa)	Ứng dụng
SEPHADEX (Dextran)		
G-10	< 0,7	Để loại muối
G-25	1 – 5	Để loại muối
G-50	1,5 – 30	Để phân tách các peptid
G-75	3 – 80	Để phân tách các protein
G-100	4 – 150	Để phân tách các protein
G-150	5 – 300	Để phân tách các protein
G-200	5 – 600	Để phân tách các protein

SEPHAROSE (Agarose)		
6 B	10 – 4.000	Để phân tách các protein
4 B	60 – 20.000	Để phân tách các protein
2 B	70 – 40.000	Để phân tách các acid nucleic; các vi khuẩn

SEPHACRYL (Dextran nối mạng ngang với *N,N'*-metylenbisacrylamid)		
S-100 HR	1 - 100	Để phân tách các peptid, protein
S-200 HR	5 - 250	Để phân tách các protein
S-300 HR	10 – 1.500	Để phân tách các protein
S-400 HR	20 – 8.000	Để phân tách các protein
S-500 HR	80 – 80.000	Để phân tách các đại phân tử

BIOGEL (Polyacrylamid)		
Loại gel	(KDa)	Ứng dụng
P- 2	0,1 – 1,8	Để loại muối
P- 4	0,8 – 4	Để loại muối
P- 6	1 – 6	Để phân tách các peptid
P- 10	1,5 - 20	Để phân tách các protein
P- 30	2,5 - 40	Để phân tách các protein
P- 60	3 – 60	Để phân tách các protein
P- 100	5 – 100	Để phân tách các protein
P- 150	15 – 150	Để phân tách các protein
P- 200	30 – 200	Để phân tách các protein
P- 300	60 – 400	Để phân tách các protein

SUPERDEX (Dextran tạo nối hóa trị với agarose nối mạng ngang chặt chẽ)		
75	3 - 70	FPLC sắc ký gel (Fast protein liquid chromatography)
200	10 - 600	FPLC sắc ký gel
SUPEROSE (agarose nối mạng ngang)		
12	1 - 300	FPLC
6	5 - 5000	FPLC

FRACTOGEL (clorur polyvinyl)		
TSK HW - 40	0,1 – 10	FPLC (peptid)
TSK HW - 55	1 - 700	FPLC (protein)
TSK G 2000SW	5 - 100	FPLC (protein)
TSK G 3000SW	10 – 500	FPLC (protein)
TSK HW - 65	50 – 5.000	FPLC (protein)
TSK HW - 75	500– 50.000	FPLC (protein)

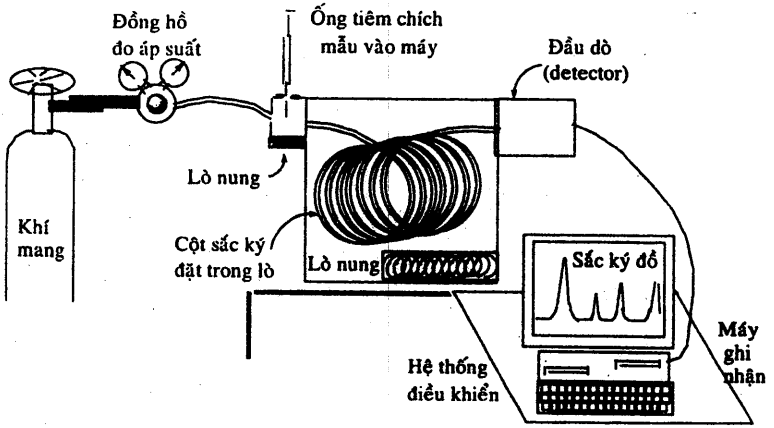
CÁC PHƯƠNG PHÁP CÔ LẬP HỢP CHẤT HỮU CƠ

Chương 7

SẮC KÝ KHÍ

Sắc ký khí đã được biết từ năm 1906 nhưng mãi đến năm 1952, kỹ thuật này mới được phát triển mạnh mẽ, nhất là trong thập niên 1960.

Trong việc phân loại các kỹ thuật sắc ký, có sự phân loại dựa theo cấu hình (chromatography configuration), nghĩa là pha động là một hợp chất ở thể khí và pha tĩnh có thể ở thể khí hoặc thể lỏng. Cấu hình như thế được gọi là ***sắc ký khí*** (gas chromatography), thường hay được gọi tắt là GC.



Hình 1: Sơ đồ tổng quát mô tả các bộ phận của một máy sắc ký khí

Trong sắc ký khí, đôi khi người ta còn nói thêm đó là ***sắc ký khí – lỏng*** (gas – liquid chromatography, viết tắt là GLC), hoặc ***sắc ký khí – rắn*** (gas –solid chromatography, viết tắt là GSC) nhằm cho biết rõ thêm về pha tĩnh là pha lỏng hoặc là pha rắn. Phần lớn các máy sắc ký khí là loại sắc ký khí – lỏng và như thế đây là loại sắc ký phân chia (partition chromatography),

nghĩa là các hợp chất khác nhau trong hỗn hợp mẫu khảo sát sẽ phân bố (hòa tan) vào hai pha là pha động khí và pha tĩnh lỏng (xem lại chương sắc ký cột).

Sắc ký khí là kỹ thuật phân tích hiệu quả với độ phân giải cao, có thể giúp khảo sát một mẫu chất có trọng lượng vài miligam và đôi khi chỉ vài microgram; có thể phân tích một hỗn hợp mẫu chất phức tạp; có thể phân tích định lượng...

Kỹ thuật sắc ký khí được sử dụng để phân tích một lượng rất lớn những loại hợp chất hữu cơ khác nhau, các hợp chất đó có thể là chất khí hoặc chất lỏng, đôi khi là chất rắn. Tuy nhiên, đối với các ***loại hợp chất không bền nhiệt, kém bay hơi (trọng lượng phân tử lớn hơn 300 amu) hoặc loại hợp chất ion***, kỹ thuật sắc ký khí không thể phân tích mẫu trực tiếp ngay được, mà cần phải biến đổi các hợp chất nói trên thành các dẫn xuất có tính bay hơi, mới có thể phân tích bằng sắc ký khí.

Hình 1 mô tả các bộ phận hoạt động của một máy sắc ký khí. Trong sắc ký khí, pha động là một chất khí thường được gọi là khí mang. Khí này xuất phát từ một bình khí nén thành một dòng khí có thể điều chỉnh lưu lượng bởi những van khoá, để đi vào một cột có chứa pha tĩnh. Tại cột này, các thành phần khác nhau của hỗn hợp mẫu khảo sát sẽ được tách riêng ra. Mẫu chất khảo sát hoặc các hợp chất chuẩn được chích vào dòng khí mang tại một vị trí ở đầu cột pha tĩnh, rồi đi ngang qua pha tĩnh được tách thành những hợp chất riêng rẽ và ra khỏi cột. Các hợp chất khác nhau của hỗn hợp mẫu chất ban đầu được bộ phận phát hiện ghi nhận (bằng các tín hiệu điện tử) và giao diện của máy biến đổi tín hiệu đó thành các mũi xuất hiện trên sắc ký đồ. Máy in sẽ in sắc ký đồ ra trên giấy.

1. CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN HIỆU QUẢ TÁCH CHẤT TRONG SẮC KÝ KHÍ

1.1. Áp suất hơi của một hợp chất

Trong chương sắc ký cột, pha động luôn là chất lỏng, cơ chế phân chia (partitioning mechanism) là sự hòa tan một cách tương đối của những cấu

phần khác nhau của một hỗn hợp mẫu chất khảo sát vào trong hai pha: pha động và pha tĩnh.

Trong loại sắc ký khí – lỏng (GLC) cơ chế phân chia cũng là sự hòa tan của những cấu phần khác nhau của một hỗn hợp mẫu chất khảo sát vào pha tĩnh lỏng; nhưng với sắc ký khí còn có thêm một yếu tố nữa đó là áp suất hơi tương đối của mỗi cấu phần của hỗn hợp mẫu chất, nên sự phân chia xảy ra giữa một pha là chất lỏng và pha kia là chất khí. Hơn nữa, vì pha động là chất khí nên các cấu phần của hỗn hợp mẫu chất khảo sát phải ở thể khí hoặc cũng có thể là những chất lỏng nhưng phải có áp suất hơi tương đối cao (vì thế máy sắc ký khí vận hành ở nhiệt độ cao).

Áp suất hơi có thể được định nghĩa một cách đơn giản là áp suất tạo ra bởi những phân tử của một chất khí ở trong điều kiện cân bằng với những phân tử của chính nó nhưng ở thể lỏng, tất cả các phân tử này đều ở trong một ống hàn kín.

Áp suất hơi là số đo cho biết khả năng của những phân tử chất lỏng có thể biến đổi từ thể lỏng thành thể khí. Các hợp chất có trọng lượng phân tử nhỏ, tính phân cực kém, sẽ có giá trị *áp suất hơi* lớn và ngược lại, các hợp chất có trọng lượng phân tử lớn, tính phân cực mạnh, có giá trị *áp suất hơi* nhỏ.

Thí dụ, các hợp chất lỏng có áp suất hơi cao như: dietyl eter, aceton, cloroform... các hợp chất lỏng có áp suất hơi nhỏ như: nước, các alcol có trọng lượng phân tử nhỏ, các halogenur thơm.

Bảng 1: Liên quan giữa áp suất hơi và thời gian lưu của hợp chất trong một sắc ký khí.

Áp suất hơi của hợp chất	Khả năng hòa tan vào pha tĩnh	Thời gian lưu
Cao	Thấp	Nhỏ
Cao	Cao	Trung bình
Thấp	Thấp	Trung Bình
Thấp	Cao	Lớn

Trong sắc ký khí, các hợp chất đi ra khỏi cột nhanh hoặc chậm tuỳ theo yếu tố như trình bày trong bảng 1.

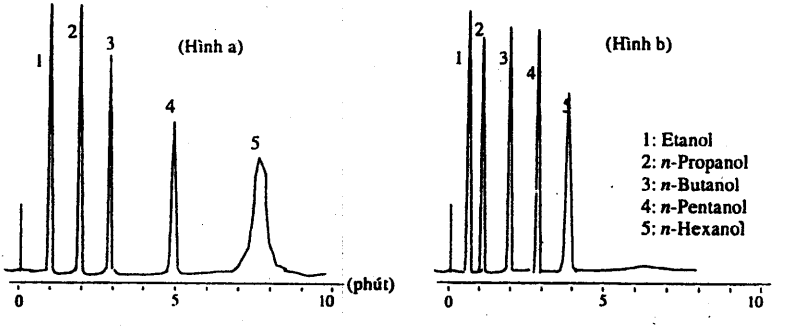
* Các hợp chất có *áp suất hơi* lớn, chịu tác động mạnh mẽ bởi dòng khí pha động, sẽ nhanh chóng đi ra khỏi cột (với điều kiện các hợp chất này hòa tan kém vào pha tĩnh). Các hợp chất này có thời gian lưu nhỏ.

* Các hợp chất có *áp suất hơi* lớn, nhưng khả năng hòa tan vào pha tĩnh cũng lớn, sẽ ra khỏi cột chậm hơn, có thời gian lưu trung bình.

* Các hợp chất có *áp suất hơi* nhỏ, có khả năng hòa tan vào pha tĩnh lớn, sẽ ra khỏi cột rất chậm, có thời gian lưu lớn.

Các nghiên cứu cho thấy có mối liên quan giữa nhiệt độ của cột và thời gian lưu của bất kỳ hai hợp chất ở kề nhau trên sắc ký đồ. Khi gia tăng nhiệt độ của cột, thời gian lưu tương đối của một hợp chất sẽ giảm, khiến cho các mũi tín hiệu sát lại gần nhau hơn.

Hình 2 là sắc ký đồ của một hỗn hợp gồm năm alcol theo tỉ lệ (1:1:1:1:1). Khi triển khai sắc ký *với điều kiện đẳng nhiệt* 100°C, các hợp chất ra khỏi cột ở những khoảng thời gian cách xa nhau. Khi thực hiện *với chương trình nhiệt độ*, khởi đầu ở 100°C và nâng nhiệt độ của cột lên 150°C, các cấu phần trong hỗn hợp đều có thời gian lưu bị giảm nên dãy băng của các cấu phần được rút gần lại với nhau.



Hình 2: Sắc ký khí một hỗn hợp gồm năm alcol theo tỉ lệ (1:1:1:1:1).
Cột Carbowax 20. Kích thước cột: 2m x 1/8 inch. Khí mang nitơ với tốc độ dòng khí 30 ml/phút.
Lượng mẫu chích vào cột 1µl. Đầu dò: FID.
Hình a: Thực hiện ở điều kiện đẳng nhiệt 100°C.
Hình b: Thực hiện với chương trình nhiệt độ 100 - 150°C (nâng 15°C/phút)

Trong thực nghiệm, để có thể đạt được sự tối ưu trong việc tách các hợp chất, cần phải lựa chọn nhiệt độ cột cũng như chương trình nhiệt thích hợp. Khi thực hiện sắc ký khí của những hỗn hợp phức tạp, người ta đều thực hiện với chương trình nhiệt độ.

1.2. Đặc trưng của các loại cột sắc ký khí

Về tổng quát có ba loại cột sắc ký khí.

a) Sắc ký khí–lỏng (GLC) với cột sắc ký là cột nhồi, trong đó pha tĩnh là một chất lỏng bao phủ lên trên những hạt trơ sử dụng như chất mang.

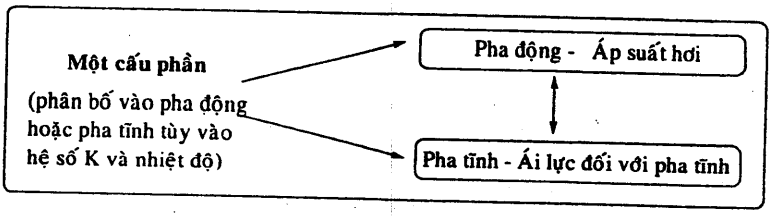
b) Sắc ký khí cột mao dẫn (capillary column, tubular column) với cột sắc ký là một ống hình trụ, pha tĩnh là chất lỏng hoặc chất rắn tráng phủ lên bề mặt bên trong của thành ống.

Loại này được gọi bằng nhiều từ ngữ khác nhau như: ống mao quản hoặc ống trụ hở với mặt trong của thành ống được tráng phủ bởi một lớp mỏng 0,2–5,0μm (wall coated open tubular, WCOT); cột được nhồi bởi chất rắn là những hạt có lỗ rỗng (porous layer open tubular, PLOT); ống trụ hở với bề mặt thành ống được tráng phủ một lớp (surface coated open tubular, SCOT).

c) Sắc ký khí–rắn (GSC) với cột sắc ký là cột nhồi; cột được nhồi đầy bằng những hạt trơ, rắn. Các hạt này có thể là alumin hoặc những hạt polymer có nối mạng ngang.

Trong cả ba trường hợp, luôn luôn có pha động khí chuyên chở các hợp chất ở thể khí đi ngang qua pha tĩnh. Việc tách riêng từng cấu phần của hỗn hợp tùy thuộc vào sự tương tác của các cấu phần đó đối với pha tĩnh, hệ quả là thời gian lưu của mỗi cấu phần sẽ khác nhau. Có hệ số phân bố K như sau.

Hệ số $K = \frac{C_{SP}}{C_{MP}}$ = Nồng độ của một cấu phần trong một đơn vị thể tích pha tĩnh / Nồng độ của một cấu phần trong một đơn vị thể tích pha động



Trong sắc ký khí, tỉ lệ phân bố của mỗi cấu phần của hỗn hợp vào hai pha động và tĩnh tuỳ thuộc vào áp suất hơi của cấu phần đó, vào tính chất nhiệt động học chung của toàn thể cấu phần có trong mẫu khảo sát và vào ái lực (khả năng hòa tan) của mỗi cấu phần đối với pha tĩnh. Sự cân bằng này tùy thuộc vào nhiệt độ vì thế, cột chứa pha tĩnh cần phải được điều chỉnh sao cho thật đúng và chuẩn xác.

Phương trình Clausius Clapeyron mô tả mối liên quan giữa áp suất hơi p° và nhiệt độ của cột sắc ký

$$\ln (p^\circ) = - \frac{\Delta H_V}{RT} + C$$

ΔH_V : Nhiệt mol bốc hơi của cấu tử
T : Nhiệt độ của cột sắc ký
R : Hằng số khí
C : Hằng số

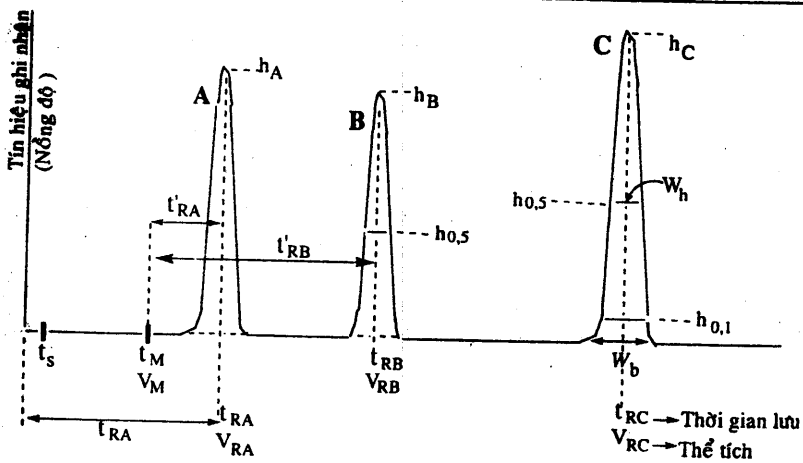
Một cấu phần nào đó bị lưu giữ lâu trong cột sắc ký, nghĩa là thể tích lưu lại trong cột của nó (specific retention volume) sẽ thay đổi theo nhiệt độ.

Thời gian lưu tương đối của một cấu phần sẽ giảm khi gia tăng nhiệt độ của pha tĩnh và các cấu tử của hỗn hợp sẽ được giải ly ra khỏi cột với thời gian lưu gần sát nhau (Hình 2).

1.3. Độ phân giải R_S (Resolution)

Một sắc ký đồ lý tưởng đạt được khi tất cả các chất phân tích trong hỗn hợp mẫu được tách rời riêng biệt với độ phân giải cao, trong một khoảng thời gian tối thiểu. Độ phân giải tùy thuộc vào đặc trưng của các cấu phần, hiệu năng tách của cột.

Một sắc ký đồ với các chi tiết đặc trưng được trình bày trong hình 3.



Hình 3: Dữ liệu và các ký hiệu trên sắc ký đồ của ba hợp chất A, B và C

t_s: thời gian chết (dead time, thời gian để pha động đi ngang qua cột).

V_M: thể tích chết (dead volume, thể tích pha động trong cột).

t_A: thời gian lưu trong cột của hợp chất A tính từ lúc chích mẫu (thời gian hợp chất A đi ngang qua rồi ra khỏi cột).

t_{RA}: thời gian lưu đã được hiệu chỉnh của hợp chất A (corrected retention time).

V_{RA}: thể tích pha động cần thiết để giải ly hợp chất A ra khỏi cột (retention volume).

V'_{RA}: thể tích lưu giữ đã được hiệu chỉnh của hợp chất A (corrected retention volume).

A_A: diện tích mũi của hợp chất A.

h_A: chiều cao của mũi của hợp chất A (peak height). $h_{0,5}$: chiều cao của ½ mũi (peak half height).

$h_{0,1}$: chiều cao của 10% mũi (10% peak height).

W_b: chiều ngang của mũi tại đáy (width at the base of a peak).

W_h: chiều ngang của mũi tại ½ chiều cao (width of the peak at half height).

Một sắc ký đồ được xem là phân giải tốt khi các tín hiệu mũi ở gần bên nhau tách rời nhau ra, nghĩa là tín hiệu đường nền (base line) của các mũi này tách rời ra.

Độ phân giải R_S được định nghĩa căn cứ vào chiều ngang của mũi tại ½ chiều cao của mũi, với các công thức sau

$$R_S = \frac{(t_{RB} - t_{RA})}{\frac{1}{2}(W_{bB} + W_{bA})} = \frac{2\Delta t}{(W_{bB} + W_{bA})} \# \frac{\Delta t}{W_{bB}}$$

Hoặc $$R_S = \frac{(t_{RB} - t_{RA})}{(W_{hB} + W_{hA})} \# \frac{\Delta t}{2W_{hB}}$$

Theo như công thức nêu trên, để đạt được việc tách mũi tốt, khoản thời gian lưu Δt của hai mũi liền kề *phải nhỏ hơn* bề ngang của mũi tại ½ chiều cao của mũi.

Cũng có thể tính độ phân giải theo chiều cao của 10% mũi, với công thức sau.

$$h_v \leqslant 0{,}1\left(\frac{h_A + h_B}{2}\right) \leqslant 0{,}1\,\bar{h} \qquad R_S \# 0{,}1\left(\frac{\bar{h}}{h_v}\right)$$

Độ phân giải R_S là một hàm biến đổi theo các đặc trưng của các cấu phần trong hỗn hợp phân tích, hiệu năng tách của cột... Những việc này được thể hiện bằng hệ số lưu giữ K của cột (hệ số khả năng) và hiệu năng tách của cột, N.

N còn được gọi là số mâm lý thuyết có trong cột. Khái niệm này có nghĩa tương tự như các mâm trong một cột chưng cất phân đoạn một hỗn hợ chất lỏng. Cột sắc ký được xem như được tạo thành bởi những thể tích bằn nhau được đặt sát bên nhau, gọi là mâm lý thuyết.

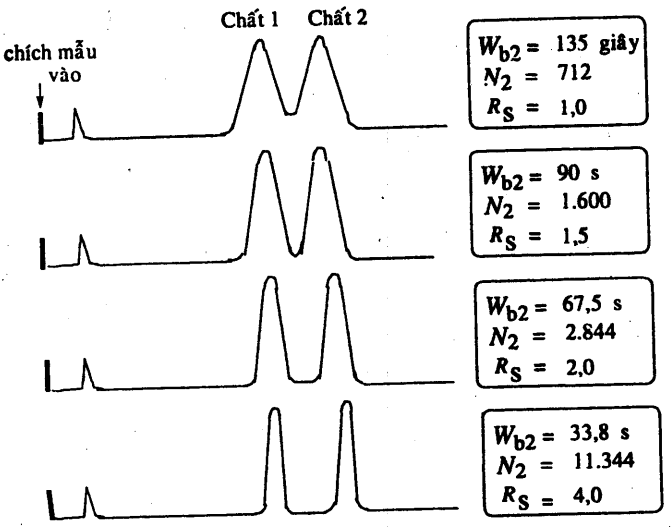
Trong thực nghiệm, một cột sắc ký có hiệu quả tách cao khi có W_b nhỏ H nhỏ, N lớn và $R_S \geq 1{,}2$

$$k = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A}$$

$$N = \frac{L}{H} = 16\left(\frac{t_R}{W_b}\right)^2 = 5{,}54\left(\frac{t_R}{W_h}\right)^2$$

K_A: hệ số lưu giữ của hợp chất A
α: hệ số tách
L: chiều dài của cột
H: chiều cao tương đương với một mâm lý thuyết
N: hiệu năng tách của cột
W_b: chiều ngang của mũi tại đáy



Hình 4: Minh hoạ các sắc ký đồ: độ phân giải càng cao khi giá trị W_b càng nhỏ và N càng lớn

2. CÁC BỘ PHẬN CỦA MÁY SẮC KÝ KHÍ

Hình 1 mô tả tổng quát các bộ phận của một máy sắc ký khí.

2.1. Khí mang (carrier gas)

Khí mang còn được gọi là khí vectơ. Trong sắc ký khí, khí mang đóng vai trò là pha động để vận chuyển các thành phần của mẫu phân tích xuyên ngang cột sắc ký, đến bộ phận phát hiện tín hiệu.

Việc lựa chọn khí mang giữ một vai trò quan trọng trong việc tách hỗn hợp mẫu chất cũng như để cho bộ phận ghi nhận tín hiệu có thể hoạt động hiệu quả. Khí mang phải có tính trơ: không tác dụng với nguyên liệu nhồi cột sắc ký cũng như với mẫu phân tích. Khí mang như hydrogen, helium giúp tách mẫu tốt hơn là các loại khí có trọng lượng phân tử lớn hơn, thí dụ như nitrogen, dioxide carbon, argon.

Bảng 2 cho biết độ nhớt và độ dẫn nhiệt của một số khí mang.

Bảng 2: Độ nhớt và độ dẫn nhiệt của một số khí thường được sử dụng làm khí mang.

Khí mang	Trọng lượng phân tử	Độ nhớt (μp)	Độ dẫn nhiệt (cal. s^{-1} cm^{-2} . $°C^{-1}$. cm^{-1})x 10^{-6}
CO_2	44	189	42
Ar	40	269	44
O_2	32	256	66
N_2	28	219	64
He	4	228	369
H_2	2	108	459
Metan	16	-	86
Etanol	46	-	35

Các tạp chất trong khí mang như không khí, hơi nước, vết các loại khí hydrocarbon có thể tác dụng với mẫu chất; làm hư hại cột sắc ký; làm ảnh hưởng đến bộ phận phát hiện tín hiệu... Thí dụ, nước thường được giữ lại trong cột lâu hơn so với các hợp chất khác và được giải ly ra khỏi cột thành một mũi tròn bầu, thấp, làm ảnh hưởng đến mức zero của đường nền (base line zero).

Khí mang được cung cấp bởi một bình khí áp suất cao, lên đến 3000 psi (20,7MPa). Khí mang phải có độ tinh khiết 99,999%. Khi mở bình, khí bay ra, đi ngang qua một bộ phận điều chỉnh lưu lượng, đó là đồng hồ đo áp suất. Cần nên cho khí mang đi ngang qua hệ thống phòng bị để loại bỏ các tạp chất. Hệ thống gồm một chuỗi các bình có chứa các hạt rây phân tử (molecular sieve) 5Å để giữ nước; than hoạt tính để giữ hydrocarbon; silica gel để giúp pha động không còn chứa oxygen.

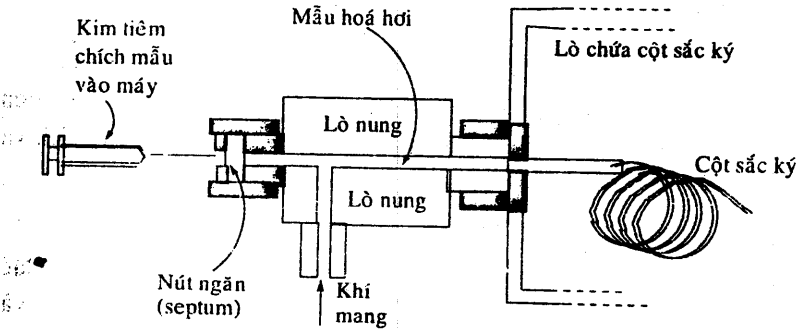
Trong thực nghiệm, thường sử dụng khí mang nitrogen cho cột nhồi PLOT (packed column) và helium hoặc hydrogen cho cột vi quản WCOT.

Khí nitrogen thường được sử dụng với cột nhồi, với tốc độ dòng khí 30–50 ml/phút.

2.2. Bộ phận đưa mẫu vào máy

Bộ phận đưa mẫu vào máy là nơi mà mẫu từ bên ngoài được đưa vào bên trong máy sắc ký. Bộ phận này gồm ống bằng thủy tinh hoặc thép không gỉ, một đầu ống nối vào bên trong máy sắc ký, còn đầu kia tiếp xúc với bên ngoài; đầu này có gắn một nút ngăn bằng cao su silicon dầy 2,3–3,2 mm (septum). Nút ngăn bằng cao su sau vài lần bị kiêm tiêm xuyên qua, bị thủng lỗ, không bịt kín ống được nữa, sẽ dễ dàng được thay thế. Ống này còn có một nhánh ngang để dẫn khí mang vào máy. Các ống được đặt trong một lò nung.

Mẫu được đưa vào bên trong máy nhờ một kim tiêm loại nhỏ, thể tích 1–10 µl, chích xuyên thủng qua nút ngăn, để đưa một lượng rất nhỏ (0,1–3 µl) dung dịch mẫu vào bên trong ống. Nhờ lò nung, mẫu nhanh chóng hoá thành hơi và theo dòng khí mang đi vào cột sắc ký.



Hình 5: Mô tả bộ phận đưa mẫu vào máy sắc ký khí

Bảng 3: Lượng thể tích mẫu chích vào máy cho từng loại cột sắc ký khí.

Đường kính cột sắc ký	Lượng thể tích tối đa cho một lần chích mẫu vào máy (µL)
1/4 in (cột nhồi)	100
1/8 in (cột nhồi)	20
0,2–0,3 mm (Cột mao quản)	0,1

Khi đưa mẫu vào trong máy, một lượng mẫu 0,1–3 µl tuy thấy thật nhỏ nhưng khi hoá hơi thì trở nên lớn, vượt quá mức chứa đựng (overload) của cột sắc ký nên khiến cho toàn thể mẫu không thể đi vào cột cùng một lượt, mà phải trãi qua một thời gian. Vì lý do đó, tại bộ phận này có gắn thêm một thiết bị để chỉ cho phép một lượng nhỏ mẫu (# 1%) đi vào cột sắc ký, còn phần lớn (99%) lượng mẫu sẽ được loại ra khỏi máy.

Bảng 3 cho biết lượng thể tích mẫu chích vào máy thay đổi tùy loại cột sắc ký. Có hai loại bộ phận đưa mẫu vào máy: có thể đưa mẫu vào máy ở thể khí hoặc dạng lỏng (mẫu rắn hoặc lỏng được pha thành dung dịch).

Dung môi dùng để pha mẫu phải đạt các yêu cầu sau.

- Không phản ứng hoá học với mẫu phân tích và nguyên liệu làm pha tĩnh.

- Phải hoà tan mẫu hòan toàn.

- Dung môi phải có thời gian lưu khác với mẫu phân tích.

Phải điều chỉnh để bộ phận chích mẫu có nhiệt độ 20–30°C cao hơn nhiệt độ sôi của hợp chất kém bay hơi nhất trong hỗn hợp mẫu phân tích và có nhiệt độ 20–50°C cao hơn cột sắc ký.

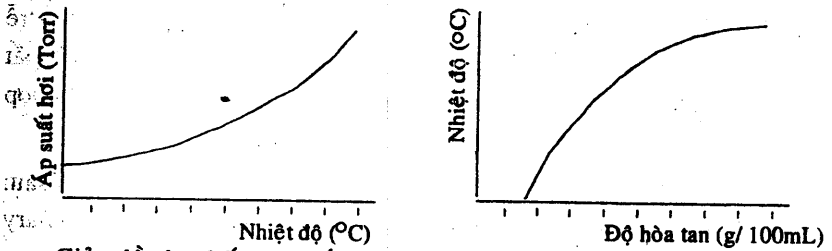
2.3. Cột sắc ký khí

Khác với các cột sắc ký của các kỹ thuật khác, cột sắc ký khí đặc biệt rất dài. Loại cột nhồi pha tĩnh thường có đường kính trong 2–6mm và dài 1–3 mét; loại cột mao quản thường có đường kính trong 0,2–0,7mm và dài 10–100 mét. Cột dài được cuộn thành các khoanh tròn có đường kính 10–20 cm. Hai đầu cột được thiết kế thành mối nối để một đầu cột dễ dàng nối với bộ phận chích mẫu và đầu kia của cột nối vào bộ phận phát hiện tín hiệu mà không có khoảng thể tích chết.

Loại cột nhồi thường được làm bằng thủy tinh (Pyrex) hoặc thép không gỉ.

Cột được đặt trong một lò nung nhỏ. Nhiệt độ lò nung thường ở khoảng 50–150°, khi cần có thể nâng nhiệt độ cao hơn.

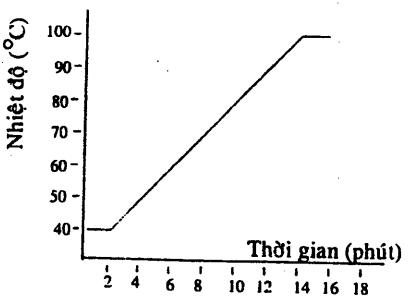
Áp suất hơi cũng như độ hòa tan của các hợp chất trong mẫu phân tích thay đổi theo nhiệt độ vì thế cần phải kiểm soát chính xác nhiệt độ để có thể đạt kết quả phân tích tốt.



Giản đồ cho thấy áp suất hơi hoặc độ hòa tan của một hợp chất thay đổi theo nhiệt độ

Có thể thực hiện sắc ký với chương trình đẳng nhiệt (isothermal) hoặc chương trình nhiệt độ (programmed temperature). Máy sắc ký có trang bị hệ thống máy tính để kỹ thuật viên có thể ra lệnh phân tích mẫu với chương trình mong muốn.

Minh hoạ một chương trình nhiệt độ để phân tích sắc ký khí. Nhiệt độ được cho nâng từ 40 độ đến 100 độ ở vận tốc 5 độ/ phút



2.4. Bộ phận phát hiện tín hiệu (detector)

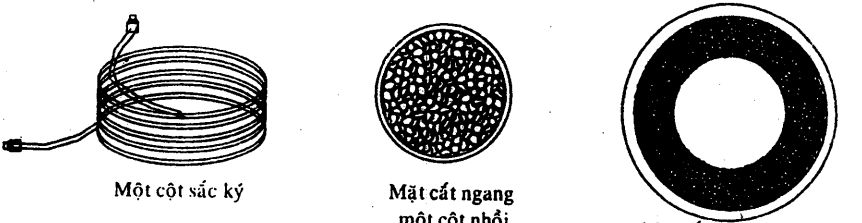
Mục đích của bộ phận phát hiện tín hiệu, còn được gọi là đầu dò, là để theo dõi khi có một khí, khác với khí mang, được giải ly ra khỏi cột sắc ký. Có nhiều loại đầu dò với công năng khác nhau.

Đầu dò được nối với máy tính cho thấy các tín hiệu xuất hiện trên màn hình. Máy tính được nối với máy in để in ra sắc ký đồ.

3. NGUYÊN LIỆU LÀM PHA TĨNH TRONG SẮC KÝ KHÍ

Quá trình tách chất xảy ra trong cột sắc ký, liên quan đến việc đạt sự cân bằng giữa pha động và pha tĩnh (hệ số phân bố) của hợp chất cần phân tích. Hệ số phân bố, nguyên do của việc hợp chất phân tích bị chậm trễ (retardation) ra khỏi cột sắc ký, lệ thuộc vào áp suất hơi của mỗi hợp chất phân tích cũng như tính chất của cả hỗn hợp mẫu. Áp suất hơi của mỗi hợp chất phân tích lại lệ thuộc vào nhiệt độ.

Cột sắc ký chứa pha tĩnh. Cột được cấu tạo theo một trong các loại sau: cột nhồi (packed column) và cột mao quản ống hở (open-tubular capillary column), với mô tả minh hoạ như hình 6.



Hình 6: Minh họa mặt cắt ngang cột nhồi (packed column) và cột mao quản ống hở (open-tubular capillary column)

3.1. Loại cột nhồi trong sắc ký khí–lỏng

Cột nhồi là một ống trụ rỗng làm bằng kim loại hoặc bằng thủy tinh, dài 2–4 mét, đường kính bên ngoài 3,17–6,35 mm. Phần ruột của cột được nhồi bằng *nguyên liệu dùng để làm pha tĩnh,* là những hạt hấp thu hoặc được nhồi bằng những hạt, mặt ngoài của hạt này được phủ bởi một lớp pha tĩnh. Các hạt thường có kích thước 60-80 mesh (0,20–0,25 mm) hoặc 80-100 mesh (0,15–0,20 mm).

Một cột nhồi được xem là tốt khi cột có 1.000–2.000 mâm (plates)/mét, vì thế một cột nhồi thường có giá trị trong khoảng 2.000–10.000 mâm. So sánh với loại cột mao quản hở có 2.000–5.000 mâm/mét, một cột mao quản thường có giá trị > 100.000 mâm lý thuyết.

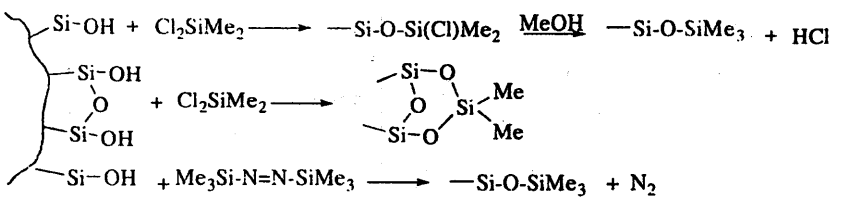
• Do cột được nén chặt nên một cột càng dài thì khí mang càng phải được tăng áp suất mới có thể đi xuyên ngang qua cột. Vì nhược điểm này, cột nhồi ngày càng ít được sử dụng.

Chất mang để nhồi cột (support) Trong sắc ký khí, pha tĩnh là pha tĩnh lỏng. Đó là *một loại chất lỏng* được cho hấp thu lên trên *bề mặt của một chất nền rắn* (solid substrate) còn được gọi là chất mang.

Nguyên liệu dùng làm chất mang phải có tính trơ và được nghiền thành bột mịn. Hạt mịn này phải có kích cỡ 125-250 μm để tạo thành vật liệu có kích thước 60-100 mesh (0,15–0,25 mm). Có nhiều loại nguyên liệu đã được sử dụng để làm chất mang nhồi cột nhưng chỉ một số ít nguyên liệu là phù hợp nhất: đất diatomit (Kieselguhr) và Teflon.

Đất diatomit là phần khung sườn silica còn lại của loại tảo đã bị mục nát phân rã, được tinh chế bởi nhà sản xuất John Manville, với tên thương mại là Chromosorb. Có nhiều loại sản phẩm Chromosorb tuỳ theo cách xử lý khác nhau để cho sản phẩm mang tính chất khác nhau như: Chromosorb P, Chromosorb W, Chromosorb 101-104.

Bề mặt của nguyên liệu diatomit có thể còn lẫn các khoáng tạp bẩn, các hợp chất khi đi ngang qua cột sẽ bị phân hủy bởi nhiệt độ. Các nhóm chức silanol (Si-OH) ở bề mặt nguyên liệu sẽ tạo nối hydrogen với các hợp chất phân cực, gây nên hiện tượng là các hợp chất phân cực cho mũi tín hiệu kéo dài. Để tránh việc này, nguyên liệu đất diatomit được xử lý bằng cách cho tác dụng với acid clorhydric để loại bỏ các khoáng tạp, tiếp theo được silan hoá bằng cách cho tác dụng với dimetyldiclorosilan (DMDCS)/metanol hoặc với hexametyldisilylazan (HMDS) nhằm khoá nhóm Si-OH.



Các nhà sản xuất chọn các loại nguyên liệu như sau

a) Nguyên liệu diatomit màu hồng, lấy từ loại đất làm gạch xây tường, được nghiền nhỏ. Đây là nguyên liệu để nhồi cột Chromosorb P. Nguyên liệu này có diện tích bề mặt (surface area) cao 4,0 m^2/g; có thể nhồi nhiều vào cột lên đến 35% (w/w). Cột này đặc biệt thích hợp để phân tích các alcan; muốn sử dụng cột để phân tích các hợp chất phân cực, phải làm giảm hoạt bằng cách silan hoá.

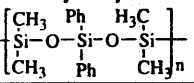
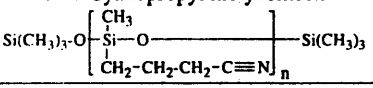
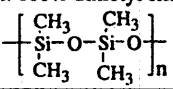
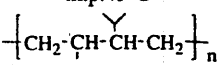
b) Nguyên liệu diatomit màu trắng, chế tạo từ đất diatomit, nghiền nhuyễn, ép lại và nung lên 900°C. Đây là nguyên liệu để nhồi cột Chromosorb W. Nguyên liệu này có diện tích bề mặt thấp 1,0 m^2/g; nhồi vào cột được ít, 5% (w/w); phù hợp để phân tích các hợp chất phân cực.

c) Chromosorb T là nguyên liệu làm từ polytetrafluoroetylen (PTFE). Nó có tính trơ, kỵ nước, nên phù hợp để phân tích các hợp chất có trọng lượng phân tử nhỏ như: nước, acid hữu cơ, phenol, amin, khí có tính acid (HF, HCl, SO_2, NO_x...).

Chromosorb T có thể sử dụng để tẩm các pha tĩnh như polyetylen glycol, Apiezon, hoặc một loại dầu fluorocarbon (như Kel-F, Fluoropak-80) nhưng sẽ rất khó nhồi cột.

Bảng 4: Một số pha tĩnh phổ biến, tên viết tắt, cấu trúc hóa học, phân loại sử dụng.

Tên thương mại	Cấu trúc hóa học của pha tĩnh	Nhiệt độ chịu được (°C)	Chỉ số McREYNOLD
DEGS	Poly(dietylenglycol succinat)	0–200	701 (rất phân cực)
Carbowax 1000	HO-(CH_2-CH_2-O)n-H	30–150	517
FFAP	(Free fatty acid phase) Carbowax kết hợp acid terephtalic	50–250	509
Carbowax 20 M	HO-(CH_2-CH_2-O)n-H	40–220	462
OV-225	Cyanopropylmetyl phenylmetyl silicon	0–280	363
OV-210	50% trifluoropropyl metyl silicon	0–280	304

OS 124	Polyphenyl eter, Tricresyl phosphat	0–210	243
Dexsil 410	Carboran cyanoetyl metyl silicon	50–400	190
OV-17	50% Phenyl metyl silicon 	0–380	177 (khá phân cực)
OV-1701	14% Cyanopropyl metyl silicon 	0–250	159
OV-7	20% Phenyl metyl silicon	0–350	118
Dexsil 400	Carboran phenyl metyl silicon	40–400	118
Dexsil 300	Carboran dimetyl silicon	50–550	95
OV-3	10% Phenyl dimetyl silicon (dầu silicon)	0–350	85
SE 54	1% vinyl, 5% phenyl dimetyl silicon	50–300	67
OV-101; SE-30	Gôm: 100% dimetyl silicon 	50–300	43 (Không phân cực)
Apiezon L	Chất bôi trơn: alcan phân nhánh, m.p.43°C 	50–280	27 (Không phân cực)
Squalan	2,6,10,15,19,23-Hexametyltetracosan	20–120	0

Chất lỏng tẩm lên chất mang để làm pha tĩnh lỏng

Trong sắc ký khí, sự tương tác giữa các thành phần của hỗn hợp mẫu với pha tĩnh lỏng đóng một vai trò quan trọng trong quá trình tách mẫu chất, nên nguồn gốc của pha tĩnh rất quan trọng.

Các nguyên liệu trình bày ở phần trên được sử dụng làm chất mang. Muốn có pha tĩnh lỏng, nhà sản xuất tẩm một loại chất lỏng lên trên bề mặt của chất mang đó.

Chất lỏng lựa chọn phải ổn định, bền nhiệt, trơ, không bay hơi trong một khoảng nhiệt độ sử dụng để phân tích mẫu. Có hàng trăm loại chất lỏng khác nhau đã được thử nghiệm để làm pha tĩnh nhưng chỉ có một số ít các chất lỏng nói trên là phù hợp.

Các loại chất lỏng để làm pha tĩnh thường được nhà sản xuất ghi kèm theo cột, dưới một tên ký hiệu thương mại, vì thế các nhà phân tích sử dụng máy sắc ký khí có ít thông tin về thành phần cấu tạo của pha tĩnh.

Các nhà sản xuất có bán các cột đã được nhồi sẵn pha tĩnh hoặc bán các loại pha tĩnh để các nhà phân tích tự nhồi cột lấy. Muốn tự nhồi cột, cân sẵn một lượng chất mang đủ nhồi cho cột với kích thước đã định trước, cân sẵn một lượng chất lỏng dùng để làm pha tĩnh lỏng, với tỉ lệ w/w mong muốn.

Với một bình cầu, cho chất lỏng pha tĩnh vào và cho thêm một loại dung môi khan (aceton, etyl acetat, metanol...) vào để hoà tan hoàn toàn chất lỏng pha tĩnh; tiếp theo, cho hết lượng chất mang rắn cần thiết vào bình cầu. Hỗn hợp trong bình cầu được cô quay chân không cho đến khô, khi đó chất lỏng đã tẩm phủ hoàn toàn lên bề mặt của các hạt chất mang.

Trước khi nhồi cột, cần phải cuộn tròn cột để có cấu hình thích hợp, có thể đặt vừa vặn vào lò. Để nhồi cột: một đầu cột được chẹn lại bằng bông thủy tinh đã được silan hoá, và đầu này được nối với một máy bơm hút chân không. Cột được dựng sao cho các khoanh tròn nằm ngang, và rót chất mang rắn đã được tẩm vào cột nhờ một phễu thủy tinh. Trong khi nhồi, vừa khỏ nhẹ vào thành cột vừa cho máy bơm hút hoạt động giúp nén chặt, không có thể tích trống trong cột.

Bảng 4 cho biết các pha tĩnh thông dụng, tên thương mại viết tắt, cấu trúc hóa học, phân loại sử dụng (nói về tính chất phân cực).

Trong bảng 4 chỉ số McREYNOLD cho biết độ phân cực của các pha tĩnh. Độ phân cực của các pha tĩnh đã được tác giả McREYNOLD sắp xếp theo thứ tự từ không phân cực đến phân cực, dựa vào mức độ lưu giữ của pha tĩnh đối với một số hợp chất dùng làm chuẩn. Pha tĩnh có chỉ số McREYNOLD càng nhỏ, càng kém phân cực.

3.2. Loại cột mao quản hở trong sắc ký khí-lỏng

Cột mao quản hở cũng là một ống rất dài 10-100 m, có đường kính trong 0,1-0,7 mm. Ống rỗng ruột, thành mặt bên trong của ống được phủ bởi một lớp mỏng (chiều dầy lớp mỏng 0,2-0,5 μm) nguyên liệu dùng làm pha tĩnh.

Ở giữa ống này, vẫn còn phần lõi trống nên dù ống rất dài (cả trăm mét) khí mang cũng có thể thổi xuyên ngang qua dễ dàng mà không cần phải tăng áp lực cho khí.

Ống mao quản được cấu tạo bằng đồng, thép không gỉ hoặc bằng thủy tinh, nhưng ngày nay nguyên liệu thường làm bằng thủy tinh silica (vitreous silica material).

Loại nguyên liệu thủy tinh silica có nhiều ưu điểm vượt trội như: tính trơ, mềm dẻo dễ uốn nắn, chứa hàm lượng kim loại thấp, chịu lực lớn, rất bền nhiệt.

Silica này được chế tạo từ tinh thể thạch anh thiên nhiên được đun nóng chảy ở 1900°C dưới áp suất thấp. Nguyên liệu đạt độ tinh khiết SiO_2 # 100%, hàm lượng kim loại 10-100 ppm, chứa 0,1% nhóm hydroxyl. Các nhóm silanol này tạo nối với các nhóm chức khác cho loại pha tĩnh tạo nối (bonded stationary phase).

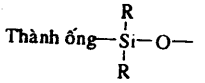
Kỹ thuật công nghệ lợi dụng các tính chất đặc trưng bề mặt của silica tinh khiết để cố định (immobilize) lên bề mặt đó *một pha tĩnh*, bằng cách với lần rửa cột đầu tiên, cho các nhóm silanol bề mặt tạo nối với polymer silicon.

Muốn có lớp pha tĩnh dầy hơn, cho các nhóm chức hoạt động của lớp polymer silicon đó (nhóm vinyl, hoặc các nhóm chức có sẵn) tạo mang ngang (cross-linking) với các hợp chất khác để tạo thành mạng ba chiều. Sự tạo mạng này được xúc tiến bằng cách chiếu tia UV xuyên bên trong ruột ống để thực hiện sự quang giải: silica tinh khiết sẽ trong suốt đối với tia UV.

Sau cùng, mặt ngoài của cột còn được tráng phủ thêm một lớp polymer như polyimid để giúp cột được bền nhiệt, lên đến 350°C.

Bảng 5 trình bày một số loại cột mao quản với các tính chất khác nhau của nhiều nhà sản xuất khác nhau.

Bảng 5: Pha tĩnh cho cột mao quản hở.

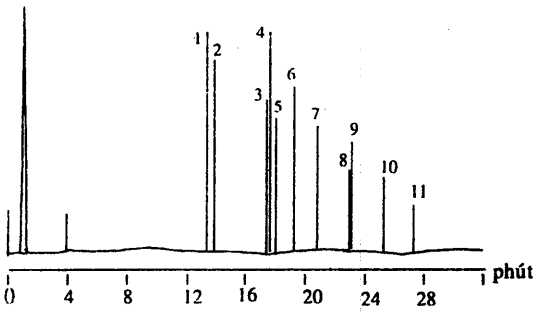


Tiếp đầu ngữ X (Nhà sản xuất)

BP® : SGE SPB ® : Supelco HP® : Hewlett Packard

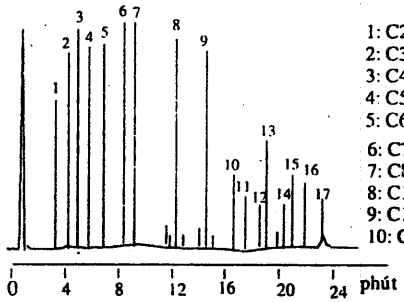
Rtx® : Restek DB® : J &W CP-SIL®: Chrompak

Pha tĩnh	Tương đương với cột nhồi	Cấu trúc hoá học nhóm R	Độ phân cực	Loại hợp chất có thể áp dụng để phân tích
X-1	OV101; SE 30	100% metyl	Không	Các dung môi, sản phẩm dầu mỏ, hợp chất hữu cơ bay hơi, polyhydrocarbon thơm, amin
X-5	SE 54	5% phenyl, 95% metyl	Không	Hợp chất thơm, polyhydrocarbon thơm, tinh dầu, thuốc uống.
X-1701 X-10	OV 1701	14% cyanopropyl 86% metyl	Trung bình	Thuốc trừ sâu, alcol, phenol, ester, ceton.
X-17 X-50	OV-17	50% phenyl 50% metyl	Trung bình	Thuốc uống, chất hoá dẻo, ester, ceton, hợp chất hữu cơ có clor
X-200 X-210	OV-210	50% trifluoropropyl, 50% metyl	Phân cực	Thuốc uống, steroid, ester, ceton, alcol, Freon
X-WAX	Carbowax 20 M	Polyetylen glycol	Rất phân cực	Dung môi, alcol, metyl ester của acid béo, acid béo, amin



1: Etanol
2: 2-Clorophenol
3: 2-Nitrophenol
4: 2,4-Dimetylphenol
5: 2,4-Diclorophenol
6: 4-Cloro-3-metylphenol
7: 2,4,6-Triclorophenol
8: 2,4-Dinitrophenol
9: 4-Nitrophenol
10: 2-Metyl-4,6-dinitrophenol
11: Pentaclorophenol

Hình 7: Sắc ký đồ một số hợp chất phenol phân tích bằng cột Rtx®-5. Cột dài 30m; đường kính trong 0,53mm, dầy 1,5μm, 40°C, 6°C/phút đến 250°C



1: C2:0 - Acid acetic
2: C3:0 - Acid propionic
3: C4:0 - Acid butiric
4: C5:0 - Acid valeric
5: C6:0 - Acid caproic
6: C7:0 - Acid enantic
7: C8:0 - Acid caprylic
8: C10:0 - Acid capric
9: C12:0 - Acid lauric
10: C14:0 - Acid myristic
11: C15:0 - Acid pentadecanoic
12: C16:0 - Acid palmitic
13: C16:1 - Acid palmitoleic
14: C18:0 - Acid stearic
15: C18:1 - Acid oleic
16: C18:2 - Acid linolic
17: C18:3 - Acid linolenic

Hình 8: Sắc ký đồ một số hợp chất acid béo tự do phân tích bằng cột có lớp mỏng rất phân cực Stabilwax-DA. Cột dài 30m; đường kính trong 0,53mm, dầy 0,25μm, 100°C, 2 phút, đến 250°C, 8°C/phút, He.

Các nhà sản xuất cũng có loại cột WCOT thủ tính để tách hai chất đối phân của những hợp chất có trọng lượng phân tử nhỏ như ester, ceton, alcan, alcol... Một thí dụ về cột thủ tính với lớp mỏng pha tĩnh có tính phân cực trung bình gồm 35% phenyl, 65% metyl siloxan có điều chỉnh bằng cách gắn thêm α hoặc β-cyclodextrin đã được permetyl hoá.

3.3. Loại cột trong sắc ký khí–rắn (Gas-solid chromatography)

Sắc ký khí-rắn là một kỹ thuật bổ sung của sắc ký khí. Sự tách chất dựa trên tính chất hấp thu trên bề mặt một chất rắn. Bề mặt rắn này là loại pha tĩnh hoạt động nhiều hơn cũng như đặc trưng lưu giữ chất mạnh hơn loại pha tĩnh là một lớp mỏng chất lỏng.

$$K = \frac{C_S}{C_M} = \frac{\text{Lượng mẫu hấp thu trên bề mặt rắn}}{\text{Áp suất riêng phần trong pha động khí}}$$

Sự tách các hợp chất phân tích bằng sắc ký khí-rắn được xác định bởi ái lực tương đối (relative affinity) của hợp chất phân tích đối với chất hấp thu, biểu diễn bằng hệ số phân bố K.

Sắc ký khí-rắn có hệ số phân bố K, hệ số lưu giữ chất k lớn hơn cột sắc ký khí-lỏng, nên kỹ thuật này có thể phân tích được các hợp chất có tính bay hơi mạnh, cột sắc ký khí-lỏng không thể phân tích được. Thí dụ, khí metan không bị giữ lại trong cột sắc ký khí-lỏng loại cột nhồi hoặc cột mao quản, nhưng cột sắc ký khí-rắn với cột nhồi chất rây phân tử hoặc nhồi chất carbosieve có khả năng tách các loại khí của khí quyển với hydrocarbon C_1-C_6.

Bảng 6: Tính chất và khả năng áp dụng của polymer vi lỗ rỗng của một vài nhà sản xuất.

Porapak	Polymer	Diện tích bề mặt (m^2/g)	Phân cực	Áp dụng
P	Styren DVB	150–200	Không	Alcol. Glycol. Ceton. Ester
P-S	Bề mặt của P được silan hoá	150–200	Không	Như P nhưng mũi ít kéo dài.
Q	DVB etylvinylbenzen	550–600	Không	Nhiều mục đích. Mẫu có nước. Hydrocarbon. Ester. Ceton. NO_x
R	DVB/4-vinyl-2-pyrolidone	400–500	Trung bình	Ester. Ceton. Aldehyd. Ester. HCl Cl_2 từ nước
S	DVB/4-vinylpyridin	300–450	Trung bình	Alcol thẳng hoặc phân nhánh
N	DVB/etylen glycol dimetacrylat	250–350	Phân cực	Hydrocarbon C_2, C_3 có giữ nhiều nước. CO_2. NH_3. Nước

T	Polymer ctylen glycol dimetacrylat	250–350	Rất phân cực	Aldehyd ngậm nhiều nước. HCH=O trong nước. Acid carboxylic. Ester
Chromasorb				
101	DVB/styren	300–350	Không	Nhiều mục đích. Alcol. Glycol. Acid béo. Ester
102	DVB/styren	300–350	Ít	Khí. Dung môi. Hydrocarbon C_2-C_6 . Alcol
103	Polystryren tạo mạng ngang	300–350	Không	Amin. Hợp chất có tính bas. Ester. ceton.
104	DVB/acetonitril	100–200	Rất	Oxid nitrogen. Khí sulfur. CO_2. Clorur vinyl
105	Poly thơm	-	Trung bình	Hợp chất thơm. Tinh dầu
106	Polystryren tạo mạng ngang	700–800	Không	Cho hợp chất không phân cực. Hydrocarbon C_3-C_8
107	Ester acrylic tạo mạng ngang	400–500	Phân cực	Dung môi. Ester. Aldehyd. ceton
108	Ester acrylic tạo mạng ngang	100–200	Phân cực	Cho hợp chất phân cực.
T	Teflon-6 (Polymer tetrafluoroetylen)	200–300	Không	Nước. Amin. Aldehyd. Khí acid. SO_2. HF. HCl. Clorosilan. Acid carboxylic.

Các kỹ thuật vận hành cũng như máy móc thiết bị của sắc ký khí-rắn cũng tương tự như sắc ký khí-lỏng, nhưng do có thể phân tích được cả các hợp chất khí nên máy có trang bị thêm một van để đưa mẫu khí cần phân tích vào cột.

Sắc ký khí-rắn sử dụng cột alumin, silica gel, rây phân tử (molecular sieves), carbon và nguyên liệu polymer xốp rỗng.

3.3.1. Chất hấp thu alumin

Alumin được sử dụng nhiều trong sắc ký khí-rắn. Đó là nguyên liệu có tính phân cực cao và có diện tích bề mặt lớn 250m^2/g. Alumin tương tác mạnh với các phân tử phân cực như nước, nhưng cũng có hoạt tính xúc tác, thí dụ biến đổi aceton thành alcol diaceton hoặc thực hiện sự khử nước.

Trong sắc ký khí-rắn, hoạt tính của alumin đã được chỉnh đổi để phù hợp cho phân tích. Chất hấp thu 2% (w/w) NaCl tẩm trên alumin tách tốt các alcan và alcen C_2-C_5. Alumin tẩm phủ bởi 10% Na_2SO_4, Na_2MoO_4, $Al_2(SO_4)_3$ được sử dụng để tách các đồng phân *cis-trans*, clorobenzen và diclorobenzen.

3.3.2. Chất hấp thu silica gel

Các hạt silica gel có những lỗ rỗng nhỏ được sử dụng để tách các hợp chất khí, tinh dầu... Tính chất bất giữ chất của silica gel là nhờ vào sự hấp thu các các vi lỗ có đường kính 50-500 nm và các nhóm chức silanol. Khả năng bất giữ tinh dầu sẽ giảm khi kích thước lỗ rỗng giảm và diện tích bề mặt tăng. Muốn làm giảm tính phân cực của silica gel, nung nóng bằng hơi quá nhiệt lên 850°C trong 24 giờ, kích thước lỗ rỗng tăng lên 1000 nm và các nhóm silanol bị silan hóa; hoặc ester hoá các nhóm silanol này bằng etanol hoặc metanol.

Porasil là nguyên liệu bán sẵn làm bằng silica gel với kích thước lỗ rỗng 150 nm, diện tích bề mặt 185m^2/g (Porasil B), và kích thước lỗ rỗng 300 nm, diện tích bề mặt 100m^2/g (Porasil C).

Nhản hiệu Durapak là Porasil đã được chỉnh đổi một số tính chất.

3.3.3. Chất hấp thu rây phân tử (molecular sieve)

Rây phân tử là zeolit tổng hợp; là các tinh thể aluminosilicat khan, thí dụ Zeolit A có công thức là $Na_{12}[(AlO_2)_2(SiO_2)_{12}]$. 27 H_2O. Có nhiều loại rây phân tử với đường ống có đường kính cỡ lỗ thay đổi trong khoảng 0,3 đến 10 nm. Zeolit A có ống với đường kính 0,40 nm. Zeolit X ống với đường kính

0,74 nm (tức 7,4 anstrong).

Các loại rây phân tử có thể hữu dụng với từng loại chất với kích thước phân tử xác định. Thí dụ kích thước của các phân tử H_2 là 0,24 nm; của khí carbonic (0,28 nm); amoniac (0,36 nm); cyclohexan (0,61 nm) và cloroform (0,69 nm). Để hút ẩm các loại dung môi hữu cơ, sử dụng hạt zeolit có đường ống với đường kính lỗ 0,30–0,40 nm. Loại rây phân tử với kích cỡ lỗ rỗng 0,40 nm sẽ làm cho các phân tử nước chui vào trong tinh thể trong khi đó các phân tử etanol vẫn nằm bên ngoài. Rây phân tử rất hữu dụng để làm khan các dung môi hữu cơ có tính phân cực mạnh. Giữa hai loại phân tử có cùng kích thước, rây phân tử hấp thu nhiều đối với phân tử nào có tính phân cực mạnh hơn.

Do tính chất hấp thu chọn lọc, rây phân tử được sử dụng trong sắc ký khí để tách các loại khí thường xuyên có trong khí mang, mặc dù dioxid carbon, giống như nước, sẽ bị hấp thu không thuận nghịch ở nhiệt độ phòng.

Một số thí dụ: Loại rây phân tử 5Å có thể tách hydrogen, nitrogen, oxygen ở nhiệt độ 100°C. Argon được tách khỏi oxygen bởi một cột 1m ở -78°C hoặc bởi một cột dài 5 m, ở 30°C. Rây phân tử 4Å hấp thu etan (đường kính 0,4 nm) mà không hấp thu butan (0,5 nm). Rây phân tử 5Å hấp thu butan và alcan không phân nhánh mà không hấp thu các hợp chất phân nhánh hoặc benzen (0,63 nm). Benzen chỉ bị hấp thu bởi rây phân tử 10X và 13X.

3.3.4. Chất hấp thu polymer vi lỗ rỗng (Microporous polymer)

Sự trùng hợp divinylbenzen (DVB) với stryren hoặc các loại monomer khác như acrylonitril, etylen glycol dimetacrylat... tạo nên các polymer có lỗ rỗng siêu nhỏ. Sự lưu giữ chất phân tích nhờ vào sự kết hợp đồng thời hai hiện tượng: sự hấp thu trên bề mặt và sự phân bố (partition) do sự tương tác với polymer như là "pha tĩnh rắn".

Tùy vào hàm lượng của DVB trong polymer, có loại hấp thu có diện tích bề mặt 50-500m^2/g, kích thước lỗ 10-300 nm. Chất hấp thu loại này có tính không phân cực, kỵ nước; các chất phân cực khó hấp thu lên nó vì vậy các hợp chất như nước, amin, glycol, các hợp chất có nối hydrogen sẽ nhanh chóng bị giải ly ra khỏi cột.

Giống như phần lớn các chất hấp thu dùng cho sắc ký khí-rắn, chất hấp thu polymer vi lỗ rỗng chỉ được sử dụng để phân tích các hợp chất có trọng lượng phân tử tương đối nhỏ và có nhiệt độ sôi < 250°C. Sự tách chất được thực hiện ở khoảng nhiệt độ 50-100°C, cao hơn so với khi thực hiện với loại cột nhồi sắc ký khí cổ điển. Các hợp chất có trọng lượng phân tử lớn hơn có thể hoặc bị bắt giữ đính luôn hoặc di chuyển ra khỏi cột chậm hơn nên sắc ký đồ cho thấy vệt kéo dài ở đoạn cuối.

Bảng 6 trình bày tính chất và khả năng áp dụng của polymer vi lỗ rỗng của một vài nhà sản xuất.

4. CÁC LOẠI ĐẦU DÒ TRONG MÁY SẮC KÝ KHÍ

Mục đích của đầu dò là để theo dõi khí mang lúc nó đi ra khỏi cột sắc ký và đầu dò sẽ ghi nhận thành một tín hiệu tương ứng khi có sự thay đổi trong thành phần hoá học của khí mang. Toàn thể các tín hiệu được gọi là sắc ký đồ. Sắc ký đồ (chromatogram) là biểu đồ ghi nhận các tín hiệu xuất hiện theo thời gian, các tín hiệu có cường độ tương ứng với nồng độ của mỗi hợp chất có trong khí mang.

Có nhiều loại đầu dò dùng cho sắc ký khí.

* Đầu dò dẫn nhiệt (thermal conductivity detector, TCD) (katherometer)

* Đầu dò ion hóa ngọn lửa (flame ionization detector, FID)

* Đầu dò bắt điện tử (electron capture detector, ECD)

* Đầu dò nitrogen-phosphor (nitrogen-phosphorous detector, NPD)

* Đầu dò trắc quang ngọn lửa (flame photometric detector, FPD)

* Đầu dò quang ion hoá (photoionisation detector, PID)

* Đầu dò phức hợp (miscellaneous detector).

4.1. Đầu dò dẫn nhiệt (thermal conductivity detector, TCD)

Bộ phận căn bản của đầu dò dẫn nhiệt là sợi dây tóc đèn bằng bạch kim, tungsten hoặc hỗn hợp tungsten với rhenium, là một bộ phận nhạy cảm

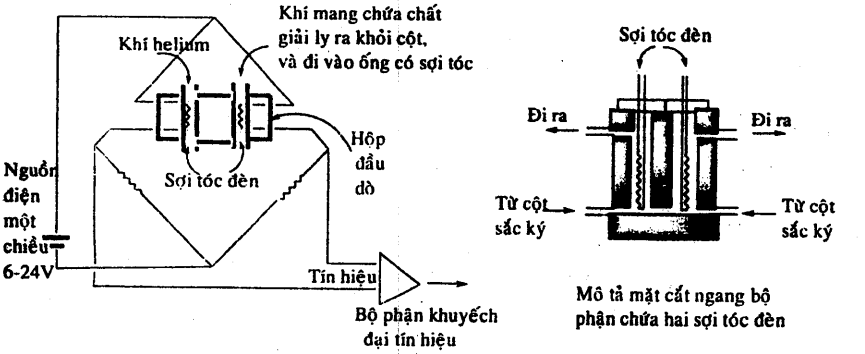
với nhiệt độ. Nguyên tắc căn bản của đầu dò dẫn nhiệt là khi các chất khí đi ra khỏi cột sắc ký sẽ có độ dẫn nhiệt khác với khí mang, thường là khí helium.

Sợi tóc đèn được đặt trong ống tại đầu ra của cột sắc ký khí. Sợi tóc này bị nung nóng bởi một dòng điện có cường độ không đổi đi ngang qua (vài mA đến 200 hoặc 300 mA). Sợi tóc bị làm lạnh bởi dòng khí helium và đạt một nhiệt độ cân bằng.

Khi một hợp chất phân tích được giải ly ra khỏi cột sắc ký khí (chất này đi theo dòng khí mang), do độ dẫn nhiệt của các khí này khác với độ dẫn nhiệt của helium nên sợi tóc đèn bị làm nguội ở nhiệt độ *khác*. Sự thay đổi trong quá trình làm nguội, nghĩa là có hiện tượng nhiệt độ thay đổi, khiến cho điện trở của sợi tóc đèn thay đổi, điện áp giảm, tạo ra một mũi tín hiệu (a peak) được ghi lên sắc ký đồ.

Trong hệ thống đầu dò còn có một sợi tóc thứ nhì nằm trong một ống khác và chỉ có khí helium tinh khiết thổi qua ống này. Cả hai sợi tóc đều là thành phần của một cầu Wheatstone (như trình bày trong hình 9), nên có thể so sánh sự khác nhau giữa hai điện trở và một điện áp được ghi nhận bởi hệ thống ghi nhận tín hiệu.

Toàn bộ hệ thống được đặt trong một hộp kim loại, cách nhiệt hoàn toàn.



Hình 9: Sơ đồ đơn giản mô tả đầu dò dẫn nhiệt

Hình 10 là sắc ký đồ phân tích các loại khí thông dụng sử dụng cột nhồi chất hấp thu rây phân tử (Rt-Msieve™ 13X). Hydrogen có độ dẫn nhiệt lớn hơn helium (bảng 2) vì vậy nó cho tín hiệu là một mũi âm trên sắc ký đồ.

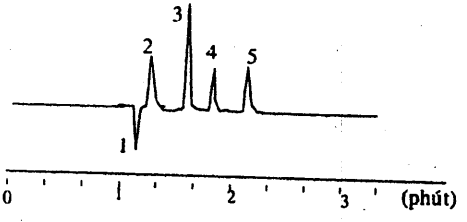
Ưu điểm

* Đầu dò dẫn nhiệt có thể phát hiện tất cả các loại hợp chất vô cơ và hữu cơ,

* Không làm hư hại mẫu khi mẫu đi ngang qua bộ phận đầu dò nên thích hợp cho loại sắc ký khí sử dụng cột điều chế (preparative GC) vì thế nó rất thông dụng, thường được trang bị trong máy sắc ký khí.

Nhược điểm

* Kém nhạy, không thể phát hiện hợp chất hiện diện ở nồng độ nhỏ.



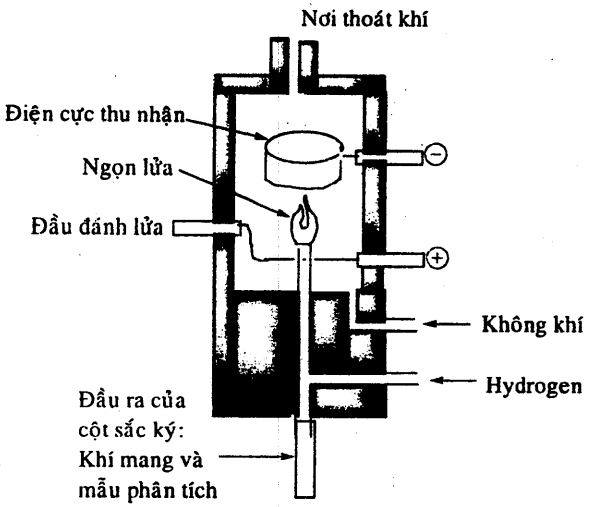
1. Hydrogen
2. Oxygen
3. Nitrogen
4. Metan
5. Monoxid carbon

Hình 10: Sắc ký đồ phân tích các chất khí thông dụng và hydrogen.

Loại cột nhồi chất hấp thu rây phân tử (Rt-Msieve™ 13X), 30m. 0,32mm ID.
Lượng mẫu các loại khí chích vào máy: 15µL. Nhiệt độ lò: đẳng nhiệt 40°C.
Nhiệt độ lúc chích mẫu/lúc phân tích: 200°C/200°C. Khí mang helium.
Đầu dò: TCD loại nhỏ. Vận tốc dòng khí: 44cm/giây.

4.2. Đầu dò ion hóa ngọn lửa (flame ionization detector, FID)

Nguyên tắt hoạt động của đầu dò ion hoá ngọn lửa: có một ngọn lửa nhỏ cháy đều nhờ khí hydrogen. Hydrogen được cho vào dòng chảy ở đầu ra của cột sắc ký, trộn đều với khí mang rồi xuất hiện ở đầu ra của ống, đi vào luồng không khí, để tạo nên ngọn lửa. Phía trên cao của ngọn lửa là một ống hình trụ rỗng làm bằng kim loại, đó là bộ phận thu nhận, giữ vai trò điện cực âm. Phần đầu của bộ phận tạo ra ngọn lửa là điện cực dương. Hai đầu điện cực sẽ tạo ra một dòng điện yếu. Hệ đầu dò còn gồm một bộ phận đánh lửa, một ống để đưa không khí vào buồng chứa ngọn lửa.



Hình 11: Sơ đồ đơn giản mô tả đầu dò ion hoá ngọn lửa

Khi một hợp chất hữu cơ đi ra khỏi cột sắc ký, được dẫn vào bộ phận đầu dò, xuyên qua ngọn lửa và bị ngọn lửa đốt cháy. Ngọn lửa hydrogen tinh khiết có chứa các gốc tự do $H^{\bullet}$, $O^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$ nhưng không có chứa các ion. Khi hợp chất hữu cơ hiện diện trong ngọn lửa, sự ion hóa sẽ xảy ra và số lượng sẽ tương ứng với số nguyên tử carbon, và như thế cũng tương ứng với số phân tử. Quá trình ion hóa được khơi mào bởi sự tạo thành $CH^{\bullet}$ từ các phân tử hữu cơ và ngay lập tức gốc này tác dụng với gốc tự do oxygen theo phản ứng sau.

$$-CH^{\bullet} + O^{\bullet} \longrightarrow -CHO^{\oplus} + e^{\ominus}$$

Nguồn gốc hóa học của phân tử hữu cơ ảnh hưởng đến sự đáp ứng theo ngọn lửa. Các ion được dẫn đến điện cực thu nhận, được điều chỉnh ở điện thế âm (khoảng -150V) so với đầu ngọn lửa. Vậy, một dòng điện khoảng 10^{-14}A được tạo ra tuỳ thuộc vào các mảnh hợp chất có mang điện tích hiện diện trong ngọn lửa với cấu trúc hoá học của hợp chất. Độ nhạy thường ở khoảng 0,015 coulom/g (carbon). Sự đáp ứng này thay đổi nhẹ tuỳ vào loại hợp chất và tuỳ vào số carbon. Các tín hiệu được khuếch đại để tạo nên một tín hiệu, một mũi xuất hiện trên sắc ký đồ.

Ưu điểm

✳ Đầu dò ion hoá ngọn lửa có thể phát hiện hợp chất hiện diện ở nồng độ rất nhỏ của tất cả các hợp chất hữu cơ. Cho đường nền (base line) trên sắc ký đồ bằng phẳng.

✳ Có tính tuyến tính cao (diện tích mũi tương ứng với nồng độ của mẫu hợp chất phân tích).

Loại đầu dò này rất thông dụng cho máy sắc ký khí vì hầu hết các hợp chất cần phân tích đều là hợp chất hữu cơ có thể đốt cháy được (flammable organic substance).

Nhược điểm

✳ Không thể phân tích tất cả các loại hợp chất; chỉ phát hiện các hợp chất hữu cơ nào có thể bị đốt cháy và phân mảnh dưới ngọn lửa hydrogen.

✳ Đầu dò ion hoá ngọn lửa không thể phát hiện các hợp chất sau: H_2, O_2, N_2, $SiCl_4$, H_2S, SO_2, COS, CS_2, NH_3, NO, NO_2, N_2O, CO, CO_2, H_2O, Ar, Kr, Ne, Xe. Các hợp chất HCHO và HCOOH cho tín hiệu rất yếu.

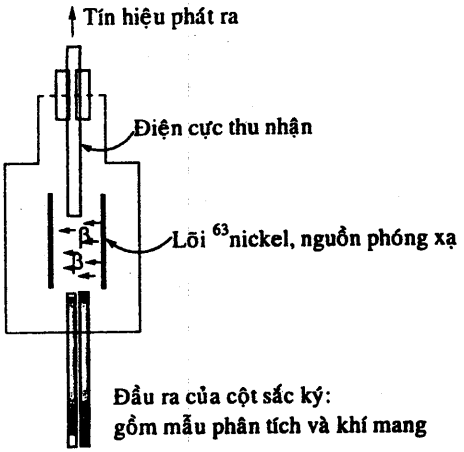
✳ Ngọn lửa cũng đốt cháy thiêu hủy mẫu nên không thể sử dụng cho kỹ thuật sắc ký điều chế.

4.3. Đầu dò bắt điện tử (electron capture detector, ECD)

Loại đầu dò này cần thiết để phân tích sự hiện diện ở dạng vết (trace) các hợp chất thuộc về môi trường thí dụ dư lượng các loại thuốc trừ sâu có chứa clor, thuốc diệt cỏ... là nhờ nó rất nhạy cảm với các hợp chất nào có chứa nguyên tố có độ âm điện mạnh (electronegative element).

Đầu dò gồm hai điện cực, một điện cực hình khối trụ rỗng bao bọc bên ngoài và một điện cực thu nhận đặt ở giữa, bên trong ống trụ rỗng nói trên. Điện cực khối trụ rỗng phóng ra tia phóng xạ beta (Tia phát xạ beta của một nguồn phóng xạ, thường là nickel-63), sẽ làm phân tử khí mang bị ion hóa (khí mang thường là nitrogen hoặc argon), tạo ra electron có năng lượng cao, các electron này được hút về điện cực thu nhận, từ đó tạo nên một dòng điện, và trên sắc ký đồ xuất hiện thành tín hiệu đường nền.

$$N_2 + \beta^{\ominus} \rightleftharpoons N_2^{\oplus} + e^{\ominus}$$
$$Ar + \beta^{\ominus} \rightleftharpoons Ar^{*} + Ar^{\oplus} + e^{\ominus}$$
$$AB + e^{\ominus} \longrightarrow AB^{\oplus} \quad \text{và} \quad A^{\bullet} + B^{\ominus}$$



Hình 12: Sơ đồ đơn giản mô tả đầu dò bắt điện tử.

Bảng 7: Mức độ nhạy của đầu dò bắt điện tử đối với một số loại hợp chất hữu cơ.

Loại hợp chất	Đáp ứng của ECD
Cloroalcan	1
Dicloroalcan	10^2
Bromoalcan	10^3
Dibromoalcan	10^5
Cloroform ($CHCl_3$)	10^5
Tetraclorur carbon (CCl_4)	10^6

Loại hợp chất	Đáp ứng của ECD
Benzen	10^{-1}
Bromobenzen	10^3
Hợp chất thơm đa nhân	$10 - 10^3$
Alcol, ester, eter mạch thẳng	1
Butan-2,3-dion	10^5

Khi một hợp chất có tính ái lực cao với điện tử (electron affinity), thí dụ như thuốc trừ sâu, tách ra từ cột sắc ký, đi vào bộ phận đầu dò, hợp chất này

sẽ bắt giữ các electron, tạo nên các gốc tự do và các ion thứ cấp có năng lượng thấp hơn, như thế làm giảm dòng điện ở đầu dò. Sự thay đổi là nguồn gốc tạo nên tín hiệu điện tử. Tín hiệu được khuếch đại, đưa đến một mũi xuất hiện trên sắc ký đồ.

Một số nguồn phóng xạ có thể sử dụng nhưng chỉ có tritium (^3H) và nickel (^{63}Ni) là phù hợp nhất. Tritium sau khi hấp thu lên một lõi titan, phóng ra một cách ào ạt các tia β yếu (18 keV), với một khoảng cách khá gần (khoảng 2 mm). Trái lại, ^{63}Ni rất bền, phóng ra các tia β (67 keV) với mức độ kém ào ạt so với ^3H, với một khoảng cách xa hơn (khoảng 5 mm). Nguồn ^{63}Ni được chuộng hơn vì có thể sử dụng lâu dài hơn và chịu nhiệt độ cao lên đến 450°C so với ^3H chỉ chịu được nhiệt độ cao lên đến 250°C.

Thứ tự đáp ứng của đầu dò với các halogen theo mức độ F < Cl< Br < I. Đầu dò được sử dụng để phát hiện các loại dung môi có chứa clor, các chất làm dẽo (plasticizer), các loại khí clorofluorocarbon, thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ (herbicide) như DDT, indran, BHC/linden...), hợp chất hữu cơ-kim loại (organometallic) thí dụ như tetra-alkyl chì, các hợp chất thơm đa nhân, NO_x và SO_2 trong ống khói.

Bảng 7 cho biết mức độ đáp ứng của đầu dò bắt điện tử đối với một số loại hợp chất so với mẫu chứng clorur *n*-butyl. So với mẫu chứng, mức độ đáp ứng tăng đối với hợp chất mang nhiều nguyên tử halogen, hợp chất thơm đa nhân, hợp chất nitro, các anhydrid, hợp chất carbonyl tiếp cách, hợp chất lưu huỳnh.

Ưu điểm

* Đầu dò bắt điện tử rất nhạy, có thể phát hiện một số loại hợp chất (như trình bày trên) khi chúng hiện diện ở nồng độ cực nhỏ.

* Không làm hư hại mẫu khi mẫu đi ngang qua bộ phận đầu dò nên thích hợp cho loại sắc ký khí sử dụng cột điều chế (preparative GC)

Nhược điểm

* Chỉ nhạy đối với một số ít loại hợp chất, còn các loại hợp chất khác sẽ không cho tín hiệu mũi trên sắc ký đồ.

4.4. Đầu dò nitrogen-phosphor (nitrogen-phosphorous detector, NPD)

Loại đầu dò này được chỉnh đổi từ loại đầu dò ion hóa ngọn lửa (FID) với một loại muối kim loại kiềm (alkali metal salt) được đúc khuôn thành một ống hình trụ rỗng, đặt ở phía trên cao, ngay trên đầu ngọn lửa; đầu dò đóng vai trò điện cực thu nhận. Ngọn lửa được điều chỉnh sao cho muối kim loại kiềm hoá thành hơi với số lượng đủ cho quá trình nhiệt-ion hóa.

Khi các hợp chất có chứa nitrogen, phosphor ở thể khí, đi ra khỏi cột sắc ký, vào buồng đầu dò, sẽ tương tác với các ion kim loại kiềm này bằng một loạt các phản ứng phức tạp khác nhau, tạo ra các ion nhiệt. Các ion này được điện cực thu nhận và như thế sẽ làm gia tăng dòng điện.

Ngày nay, điện cực của NPD làm bằng muối silicat rubidium vì nó bền nhiệt, có tuổi thọ dài. Có thể điều chỉnh để đầu dò chỉ phát hiện riêng hợp chất có chứa P hoặc phát hiện hợp chất cùng lúc chứa P và N. Nếu chỉ muốn phát hiện hợp chất có P, điều chỉnh lưu lượng khí hydrogen để duy trì ngọn lửa ở mức 40-50 ml/phút. Nếu muốn phát hiện hợp chất có N và P, điều chỉnh lưu lượng hydrogen ở mức 1-5 ml/phút

Ưu điểm

* Đầu dò nitrogen-phosphor dùng để phát hiện dư lượng các loại thuốc trừ sâu có chứa N và P tồn tại trong môi trường, các hợp chất phosphat hữu cơ (organophosphat), các hợp chất carbamat.

* Khi so sánh với đầu dò ion hóa ngọn lửa (FID), đầu dò NPD nhạy hơn gấp 50 lần (để phát hiện hợp chất có N), nhạy hơn 500 lần (để phát hiện hợp chất có P)

Nhược điểm

* Chỉ nhạy đối loại hợp chất có chứa N và P; còn các loại hợp chất không chứa N, P sẽ không cho tín hiệu mũi có thể đo để sử dụng.

* Ngọn lửa cũng đốt cháy thiêu hủy mẫu nên không thể sử dụng cho kỹ thuật sắc ký điều chế.

4.5. Đầu dò trắc quang ngọn lửa (flame photometric detector, FPD)

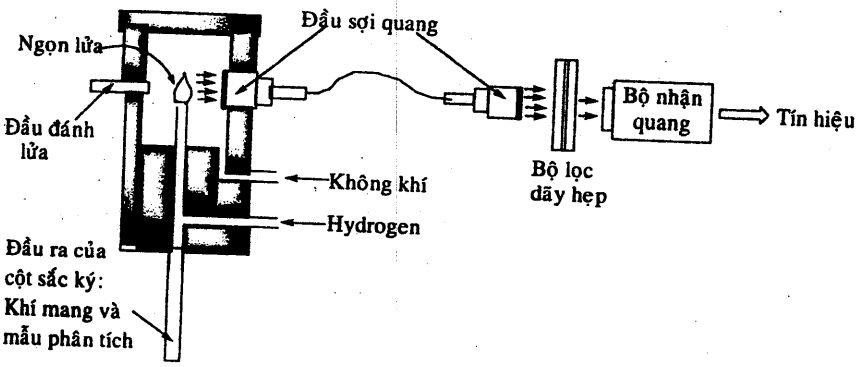
FPD cũng là một loại đầu dò ngọn lửa. Loại này cho kết quả tương đồng với đầu dò FID để có thể phát hiện hợp chất có chứa phosphor, lưu huỳnh. Loại đầu dò này đo sự bức xạ (radiation) của các loại chất khi được đốt trong ngọn lửa. Trong ngọn lửa, hydrogen, sulfur hoặc phosphor bị biến thành các mảnh, mảnh này phát ra bức xạ ở 394 hoặc 526 nm. Một số nghiên cứu cho biết các hợp chất có chứa N khi bị đốt cháy đã phát ra bức xạ ở 690 nm. Một bộ lọc dãy hẹp có tính chọn lọc độ dài sóng (wavelength) sẽ thu nhận các bức xạ đó; một bộ nhận quang (photomultiplier) sẽ phát hiện và khuyếch đại để biến thành các tín hiệu mũi xuất hiện trên sắc ký đồ.

Đầu dò trắc quang ngọn lửa sử dụng ngọn lửa hydrogen nguội hơn so với của FID. Điều này làm gia tăng sự sản sinh ra hai loại mảnh hoạt động cao là S_2^* hoặc HPO* phát ra bức xạ ở 394 hoặc 526 nm. Cơ chế phản ứng tạo thành các mảnh nói trên chưa được hiểu rõ

$$R{-}P + \alpha O_2 \longrightarrow HPO^*$$

$$2\,R{-}S + (\alpha + 2)O_2 \longrightarrow \alpha\,CO_2 + 2\,SO_2 \longrightarrow 4\,H_2O + S_2 \longrightarrow S_2^*$$

Tuy vậy, các hợp chất chứa phosphor cho các đáp ứng tuyến tính với đầu dò, còn hợp chất chứa lưu hùynh có các đáp ứng thay đổi theo bình phương nồng độ mẫu chất.



Hình 13: Sơ đồ đơn giản mô tả đầu dò trắc quang ngọn lửa

Ưu điểm

* Đầu dò trắc quang ngọn lửa có độ nhạy cao, dùng để phát hiện dư lượng các loại thuốc trừ sâu có chứa S và P tồn tại trong môi trường, phân tích các chất màu, các chất thêm vào trong thực phẩm (food additive) hoặc các loại thức uống, hợp chất hữu cơ-lưu huỳnh (organosulfur) hiện diện trong nước bia (beer).

Để phân tích các hợp chất khí có lưu hùynh như tiophen, mercaptan, disulfur, H_2S, SO_2, các sản phẩm than đá, dầu mỏ có chứa lưu huỳnh.

Nhược điểm

* Chỉ nhạy đối với loại hợp chất có chứa S và P; còn các loại hợp chất không chứa S, P cho tín hiệu mũi có thể không đủ để sử dụng.

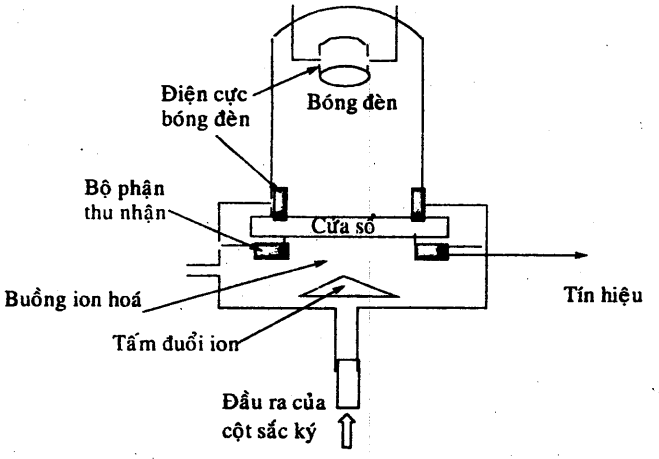
* Ngọn lửa cũng đốt cháy thiêu hủy mẫu nên không thể sử dụng cho kỹ thuật sắc ký điều chế.

4.6. Đầu dò quang ion hoá (photoionisation detector, PID)

Đầu dò quang ion hoá sử dụng năng lượng của một ngọn đèn tử ngoại chân không để ion hóa các chất phân tích vừa được giải ly ra khỏi cột sắc ký. Ngọn đèn tử ngoại phát ra tia sáng, tia sáng này đi vào buồng ion hóa ngang qua một cửa sổ làm bằng fluorur kim loại. Trong buồng này, các phân tử bị ion hóa bởi năng lượng phóng ra của ngọn đèn.

Ngọn đèn chứa đựng một khí hiếm thí dụ như argon hoặc krypton, bị kích thích bởi một dòng điện 1000 V hoặc một sóng vô tuyến 100 kHz. Bức xạ phát ra từ ngọn đèn krypton có năng lượng tương đương với bước sóng 121 nm (còn của argon ở 104 nm). Cửa sổ làm bằng fluorur magnesium sẽ có ngưỡng bức xạ 112 nm (cut-off 112 nm), làm bằng fluorur litium có ngưỡng bức xạ 105 nm nên trong suốt đối với đối với các bức xạ của đèn.

Buồng ion hóa có thể tích 50-100 µl và có chứa một điện cực đuổi (repellee electrode) ở một điện thế 100-200 V, sẽ định hướng các ion đi về điện cực thu nhận. Dòng điện ion được thành lập giữa các điện cực sẽ tạo thành tín hiệu ghi nhận.



Hình 14: Sơ đồ đơn giản mô tả đầu dò quang ion hoá

Sự ion hóa được khơi mào bởi việc phân tử chất cần phân tích A (phân tử A) hấp thu một photon, hγ. Sự ion hóa trực tiếp xảy ra do sự tạo thành các ion (ngang qua một giai đoạn) và sự ion hoá gián tiếp để tạo thành ion có liên quan đến sự kích thích ban đầu của khí mang G, chuyển năng lượng cho phân tử mẫu phân tích.

$$\text{Sự ion hóa trực tiếp}\quad A + h\nu \longrightarrow A^+ + e^-$$

$$\text{Sự ion hóa gián tiếp}\quad G + h\nu \longrightarrow G^* + A \longrightarrow A^+ + e^-$$

$$A + h\nu \longrightarrow A^* \longrightarrow A_1^+ + e^-$$

Sự ion hoá các hợp chất phân tích tùy thuộc vào thế ion hoá và năng lượng của ngọn đèn. Đèn krypton 10,2 eV có năng lượng đủ để ion hoá các hợp chất alcan, chất thơm, một số alcan dài hơn 6 carbon, alcol, aldehyd, ester. Đèn argon 11,7 eV đủ để ion hóa tất cả các loại hợp chất hữu cơ.

Ưu điểm

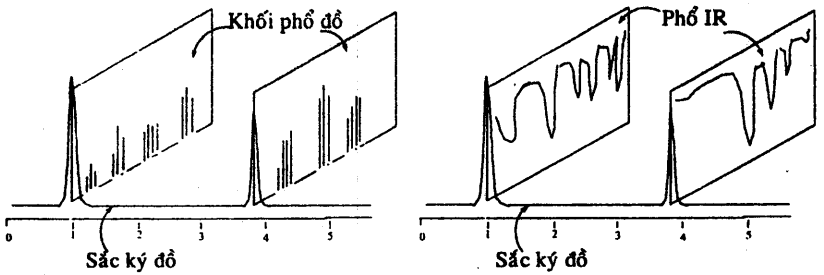
✳ Đầu dò quang ion hoá có độ nhạy cao, phát hiện mẫu hiện diện ở nồng độ nhỏ. Được xem là đầu dò nhạy, có thể áp dụng để phân tích một phổ rất rộng các loại hợp chất hữu cơ và vô cơ.

* Không làm hư hại mẫu khi mẫu đi ngang qua bộ phận đầu dò nên thích hợp cho loại sắc ký khí sử dụng cột điều chế (preparative GC)

4.7. GC-MS và GC-IR

Ngày nay máy khối phổ tứ cực và máy đo quang phổ hồng ngoại chuyển đổi Fourier được ghép vào máy sắc ký khí và được xem như một loại đầu dò hiệu quả cao.

Máy GC-MS và GC-IR có thể ghi được thời gian lưu của từng hợp chất có trong hỗn hợp phân tích và từng cấu phần đó còn được đo và ghi lại khối phổ hoặc phổ hồng ngoại.



Hình 15: Phổ đồ GC-MS và GC-IR cho thấy khi từng hợp chất riêng rẽ của hỗn hợp phân tích đi ra khỏi cột sắc ký, được máy khối phổ hoặc máy IR đo và ghi thành khối phổ hoặc phổ IR.

Sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS)

Một trong những phương tiện hữu ích giúp các nhà hóa học xác định cấu trúc hóa học của hợp chất cần khảo sát là máy sắc ký khí ghép khối phổ, thường được gọi tắt là GC-MS. Dòng khí thoát ra khỏi máy sắc ký khí được cho đi ngang qua một khóa để vào một ống, nơi có một lỗ phân tử (molecular leak) và được dẫn đến buồng ion hóa của máy khối phổ. Người ta có thể có một khối phổ đồ của mỗi cấu phần chứa trong hỗn hợp đã được chích vào máy sắc ký lúc ban đầu.

Hệ máy GC-MS có thể khảo sát một đơn chất hoặc một hỗn hợp. Trước tiên, máy sẽ tách mẫu, phân tích mẫu, kế đó, bộ phận máy tính của máy khối phổ so sánh các dữ kiện vừa thu được với các số liệu phổ chuẩn đang chứa

sẵn trong thư viện của máy, để đề nghị cấu trúc hoá học của hợp chất (đơn chất hoặc hỗn hợp) khảo sát. Máy in ra một bảng danh sách những hợp chất có khả năng giống với chất khảo sát, mỗi hợp chất đề nghị này đều có ghi kèm theo độ tương hợp (compatibility). Độ tương hợp càng lớn, trên 90%, cấu trúc của hợp chất khảo sát càng có khả năng là chất mà máy đề nghị.

Để có thể khẳng định hơn về cấu trúc hoá học của hợp chất khảo sát, cần có thêm các loại phổ khác như: IR; RMN... Máy đo khối phổ ghép vào máy sắc ký khí phải tương đối chặt chẻ và có hiệu năng cao.

Ưu điểm: Việc kết hợp hai loại máy sắc ký khí và máy khối phổ có các thuận lợi

1) ***Tính bay hơi***: Cả hai loại máy đều có thể phân tích tất cả các hợp chất khí, lỏng, rắn nếu các hợp chất này có đặc tính áp suất hơi lớn (high vapour pressure).

2) ***Độ nhạy***: Máy khối phổ có độ nhạy cao, nên có thể phân tích những hợp chất đi ra từ một cột sắc ký khí.

Thường lệ, lượng mẫu chất chích vào máy sắc ký khí vào khoảng 1 µl, có chứa khoảng 1 ppm chất tan, nghĩa là số lượng mẫu có trong 1 µl dung dịch là 10^{-9} g (1 nanogam = 1 ng = 10^{-9} g). Trong khi đó, máy khối phổ có thể phát hiện số lượng mẫu là 1 picogam (1 picogam = 1 pg = 10^{-12} g).

3) ***Nhiệt độ:*** Cột sắc ký khí và hệ thống nhận mẫu của máy khối phổ có thể hoạt động ở khoảng nhiệt độ giống nhau.

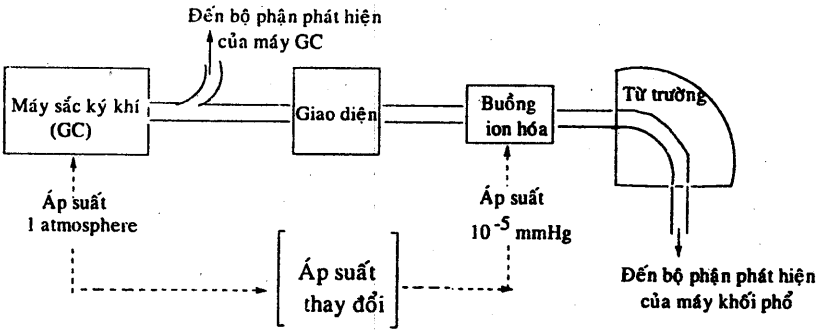
Máy sắc ký khí hoạt động trong khoảng nhiệt độ từ nhiệt độ phòng đến 300°C, tùy vào tính chất của mẫu phân tích và tùy vào pha tĩnh của cột sắc ký. Trong máy khối phổ: bộ phận nhận mẫu và buồng ion hóa hoạt động ở 200°C, để bảo đảm hiệu quả việc dịch chuyển mẫu trong hệ máy, nhưng nhiệt độ không quá cao để có thể phân hủy mẫu.

4) ***Thời gian quét*** (scan time): Máy khối phổ có vận tốc quét rất nhanh, đủ để ghi nhận hết các tín hiệu đi ra từ một cột sắc ký khí.

Thời gian cần thiết để giải ly hợp chất ra khỏi một cột nhồi sắc ký khí, làm xuất hiện một mũi (one peak) trên sắc ký đồ GC, có thể là 1 phút (với cột

mao quản có thể chỉ mất 1 giây). Để có thể quét 10 scan cho một mũi như thế, máy khối phổ cần phải có vận tốc quét 10 giây /scan. Điều này dễ dàng đạt được vì vận tốc quét của máy khối phổ cổ điển nhất cũng đạt 1 bộ mười của khối lượng /1 giây (decade/s) (Xem lại 1.1.4. Vận tốc quét), nên tất cả các máy khối phổ đều có thể hoạt động cùng với máy sắc ký khí.

Sơ đồ tổng quát sự kết hợp máy sắc ký khí với máy khối phổ GC-MS



Nhược điểm

1) ***Áp suất***: Mỗi máy hoạt động trong một điều kiện áp suất rất khác nhau, nên sự kết hợp hai máy với nhau là trở ngại lớn nhất.

Máy sắc ký khí có áp suất tại đầu ra là 1 atmospher, từ đây hợp chất khảo sát được dẫn vào buồng ion hóa của máy khối phổ có áp suất 10^{-6} torr (1 torr = 1 mmHg), vì thế giữa hai máy phải có một giao diện. Giao diện này phải chịu đựng được một sự giảm áp suất rất lớn mà không được làm hao mất nhiều mẫu khảo sát, cũng như phải tách loại bỏ bớt ít nhất 90% khí mang ra khỏi mẫu khảo sát, với mục đích làm mẫu đậm đặc càng nhiều càng tốt trước khi mẫu được cho đi vào buồng ion hóa của máy khối phổ.

(*Ghi chú: khí mang là khí sử dụng trong quá trình giải ly các hợp chất ra khỏi cột sắc ký khí, thường là khí helium*).

2) ***Loại cột sắc ký khí***: Chỉ có một số loại cột sắc ký có thể sử dụng trong máy GC-MS. Các cột loại polimer hữu cơ sẽ bị đứt mảnh khi nhiệt độ

gia tăng, mảnh nhỏ này sẽ đi vào khối phổ làm xuất hiện trên khối phổ đồ những mũi rất đặc trưng, có thể gây nhầm lẫn là các mảnh ion của mẫu khảo sát.

Hai loại cột thường dùng là polyetylenglycol (PEG, Carbowax); polymer dimetylsiloxan (OV_1)

3) ***Giá thành của máy cao***: Các phòng thí nghiệm bình thường không đủ tài chính để trang bị loại máy này cho những hoạt động thường nhật.

4) ***Cần điều chế chất dẫn xuất cho mẫu khảo sát***: Nhiều loại hợp chất khảo sát, do tính chất không thể bay hơi, nên cần phải được biến đổi thành các dẫn xuất bay hơi được, trước khi thực hiện sắc ký khí.

Cần phải lựa chọn các loại chất dẫn xuất để có thể phù hợp với việc khảo sát bằng GC-MS. Có thể điều chế dẫn xuất với trimetylsilyl (TMS), thí dụ acid carboxylic tạo thành ester TMS. Tuy nhiên các dẫn xuất silyl không phải luôn luôn cho khối phổ đồ tốt để giải đoán cấu trúc, vì thế các hợp chất alcol và amin thường được điều chế thành dẫn xuất acetyl ester; trifluoroacetyl ester hoặc metyl ester.

5. CHUẨN BỊ MẪU TRƯỚC KHI PHÂN TÍCH BẰNG SẮC KÝ KHÍ

Có nhiều hợp chất không thể phân tích bằng sắc ký khí, vì chúng không đủ tính bay hơi hoặc chúng bị pha tĩnh giữ chặt lấy nên tạo ra vệt có đuôi kéo dài. Muốn phân tích những hợp chất này bằng sắc ký khí, cần thực hiện phản ứng hoá học để biến chúng thành những dẫn xuất có tính chất bay hơi.

Các lý do để thực hiện điều chế dẫn xuất:

- Làm gia tăng tính bay hơi của hợp chất.
- Làm giảm sự giảm cấp bởi nhiệt, gia tăng tính bền nhiệt.
- Làm gia tăng khả năng đáp ứng của hợp chất đối với dầu dò của máy sắc ký khí, thí dụ gắn thêm vào hợp chất một nhóm chức như $-CF_3$ để hợp chất có thể đáp ứng với đầu dò bắt electron.
- Làm gia tăng khả năng tách riêng các hợp chất của một hỗn hợp.

Các phương pháp điều chế chất dẫn xuất được xếp loại thành ba nhóm, tuỳ thuộc vào tác chất sử dụng (reagent), các loại phản ứng đạt được, với tên gọi như: sự silyl hoá, acyl hóa; sự ester hóa hoặc sự alkyl hóa.

Trong nhiều trường hợp, sự điều chế chất dẫn xuất được tạo thành nhanh chóng ngay sau khi cho mẫu phân tích và tác chất vào chung trong dung môi. Sự alkyl thường xảy ra nhanh, nhưng nhiều phản ứng cần phải đun nóng mới xảy ra.

Thời gian chuyển đổi một hợp chất ra chất dẫn xuất thay đổi tuỳ loại hợp chất, vì vậy để có thể biết được hợp chất đã hoàn toàn biến thành chất dẫn xuất, phải theo dõi quá trình phản ứng, bằng cách, ở từng thời điểm nhất định, kiểm tra hỗn hợp phản ứng, cho đến khi phản ứng xảy ra hoàn toàn.

Phần lớn các chất dẫn xuất bền nhiệt, mặc dù các dẫn xuất trimetylsilyl có thể bị phân hủy ở nhiệt độ > 210°C bởi phần tấm thép không gỉ tại nơi chích mẫu.

Các loại dung môi có chứa hydrogen hoạt động như nước, alcol, các loại ceton dễ hỗ biến ra dạng ceton không nên sử dụng. Pyridin là dung môi thích hợp, nó cũng có thể đóng vai trò các bẫy acid và chất xúc tác tính kiềm. Dimetylformamid (DMF), toluen, metanol cũng thường được sử dụng. Các loại dung môi cần phải được tinh chế và tồn trữ trong khí nitrogen.

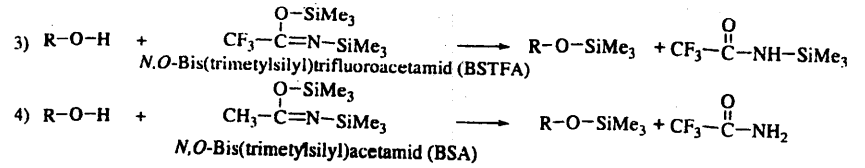
5.1. Sự silyl hoá (Silylation)

Sự silyl hoá là thay thế một hydrogen linh động của nhóm chức alcol hoặc amin của hợp chất phân tích bằng nhóm alkylsilyl thí dụ như $-SiMe_3$. Đây là phương pháp phổ biến nhất để điều chế các chất dẫn xuất có tính bay hơi. Các chất dẫn xuất tạo thành có tính bay hơi, tính bền nhiệt cao, nhưng tính phân cực kém so với chất nguyên liệu đầu.

Có thể thực hiện với các tác chất như sau.

1) $R{-}NH_2 + \underset{\text{Trimetylclorosilan (TMS)}}{Cl{-}SiMe_3} \longrightarrow R{-}NH{-}SiMe_3 + HCl$

2) $2\,R{-}O{-}H + \underset{\text{Hexametyldisilylazan (HMDS)}}{Me_3Si{-}N{=}N{-}SiMe_3} \longrightarrow 2\,R{-}O{-}SiMe_3 + N_2$



Hai tác chất đầu thường được thực hiện trong dung môi pyridin, phản ứng thường hoàn tất trong 5 phút. Hai tác chất sau thường được thực hiện trong dung môi pyridin, hoặc dimetylformamid (DMF) trong điều kiện phản ứng êm dịu, và có ưu điểm hơn vì các sản phẩm phụ có tính bay hơi mạnh và thường được giải ly ra khỏi cột sắc ký ngay lúc khởi đầu, cùng chung với dung môi giải ly.

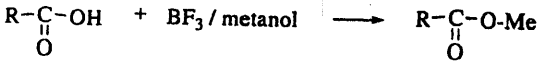
5.2. Sự acyl hoá (Acylation)

Sự acyl hoá là biến nhóm chức alcol, phenol, amin của hợp chất cần phân tích thành perfluoroacyl (còn được gọi là trifluoroacyl) bằng tác chất anhydrid trifluoroacetic.

Tác chất *N*-fluoroacylimidazol dễ dàng biến đổi nhóm hydroxyl, nhóm amino nhị cấp hoặc tam cấp thành nhóm acyl. Sản phẩm phụ imidazol tương đối trơ.

5.3. Sự alkyl hoá, sự ester hoá (Alkylation, esterification)

Có nhiều tác chất để biến đổi nhóm hydroxyl thành nhóm metyl ester, thí dụ như tác chất MeOH/ H_2SO_4; MeOH/ NaOH; trifluorur bor/metanol....

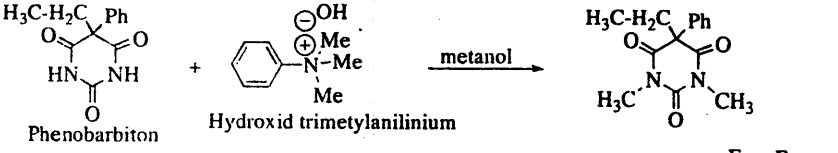


Người ta cũng có thể thực hiện sự alkyl hoá nhanh (flash alkylation) bằng cách chích vào máy cùng một lúc mẫu phân tích và tác chất alkyl hoá. Khi chích mẫu vào máy, vì nơi này đang ở nhiệt độ cao, nên dẫn xuất được tạo thành ngay. Kỹ thuật này thường sử dụng các tác chất như sau:

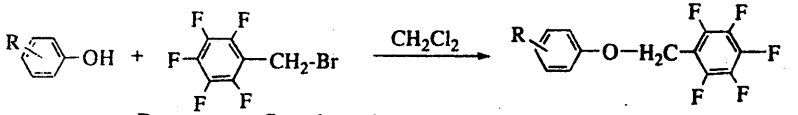
- Hydroxid tetrametylamonium hoặc hydroxid tetrabutylamonium được bán ở dạng dung dịch ở nồng độ 0,2M trong metanol, áp dụng để điều chế dẫn xuất của các loại hợp chất acid có trọng lượng phân tử nhỏ.

- Hydroxid trimetylanilinium (TMAH) cho hầu hết các loại hợp chất.

- Bromur pentafluorobenzyl cho các loại hợp chất acid, amid, phenol khi phân tích với máy có đầu dò bắt electron.



Phenobarbiton — Hydroxid trimetylanilinium



Bromur pentafluorobenzyl

6. CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN VIỆC TÁCH MẪU

Chìa khoá cho việc tách các cấu tử của một hỗn hợp đạt kết quả tốt là phải chọn một pha tĩnh phù hợp, tốc độ dòng của pha động và nhiệt độ cột đạt điều kiện tối ưu.

Trước khi phân tích mẫu, cần xem xét các yếu tố sau

✳ Mẫu chất: Trước khi chích mẫu vào máy, các *mẫu cần được tinh chế sơ bộ*, không có các vết nhờn, không bị ẩm. Không sử dụng cột vượt quá mức nhiệt độ cho phép với từng loại cột. Ống tiêm chích mẫu cần được rửa nhiều lần bằng dung dịch mẫu phân tích, để loại bỏ hết các tạp bẩn.

Tìm hiểu, ghi nhận số lượng các hợp chất hiện diện trong hỗn hợp mẫu phân tích (còn gọi là cấu phần); *khoảng* nhiệt độ sôi, áp suất hơi của các cấu phần này.

Xác định tính chất phân cực hoặc không phân cực (các nhóm định chức) của các cấu phần trong hỗn hợp mẫu.

✳ Lựa chọn hệ thống pha tĩnh (cột): loại pha tĩnh, chiều dầy của pha tĩnh tráng cột.

✳ Tối ưu hoá tốc độ dòng của khí mang để có thể hoàn tất việc phân tích mẫu trong khoảng thời gian ngắn nhất, thời gian chết ngắn nhất (helium là khí mang tốt nhất cho mọi phân tích).

✳ Tối ưu hóa chương trình nhiệt độ hoặc lựa chọn một nhiệt độ tốt nhất cho chương trình đẳng nhiệt.

✳ Kiểm tra hệ thống máy bằng cách cho phân tích thử một bộ mẫu chuẩn hoặc phân tích một hỗn hợp gồm nhiều hợp chất có độ phân cực cũng như nhiệt độ sôi khác nhau.

6.1. Lựa chọn loại cột (lựa chọn pha tĩnh)

Sự lựa chọn pha tĩnh giữ vai trò quan trọng. Lựa chọn loại pha tĩnh có độ phân cực gần với độ phân cực của mẫu chất cần phân tích.

Muốn phân tích một hỗn hợp các chất phân cực, cần chọn pha tĩnh có tính phân cực (có chỉ số McREYNOLD lớn) bởi vì các chất phân cực này hòa tan tốt và được pha tĩnh giữ chặt, và thứ tự giải ly ra khỏi cột của các hợp chất đồng đẳng sẽ theo thứ tự nhiệt độ sôi của chúng.

Nếu hỗn hợp những chất phân cực có lẫn những hợp chất kém phân cực, các chất kém phân cực sẽ ít hoà tan, nên ít bị giữ bởi pha tĩnh phân cực và hệ quả là chúng bị giải ly ra khỏi cột ***trước*** các hợp chất phân cực có cùng nhiệt độ sôi với chúng.

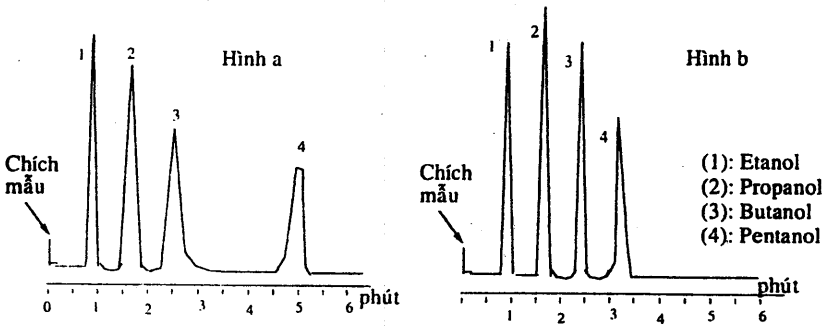
Bảng 8: Thứ tự giải ly ra khỏi cột nhồi pha tĩnh có tính phân cực hoặc không phân cực

Hợp chất	Heptan	1-Propanol	1-Butanol	1-Pentanol
Nhiệt độ sôi (°C)	98	97	117	137
Thứ tự ra khỏi cột ***kém phân cực***	1	2	3	4

Hợp chất	1-Propanol	Heptan	Octan	Nonan
Nhiệt độ sôi (°C)	97	98	126	151
Thứ tự ra khỏi cột ***phân cực***	1	2	3	4

Tương tự, hiện tượng xảy ra ngược lại với pha tĩnh không phân cực: các chất kém phân cực hòa tan tốt và được pha tĩnh không phân cực giữ chặt, và

thứ tự giải ly ra khỏi cột của các hợp chất đồng đẳng sẽ theo thứ tự nhiệt độ sôi của chúng. Nếu hỗn hợp có lẫn những hợp chất phân cực, các chất phân cực mạnh bị giải ly ra khỏi cột ***trước*** các hợp chất kém phân cực có cùng nhiệt độ sôi với chúng.



Hình 16: Phổ đồ GC của một hỗn hợp bốn alcol.

Cột: 10% PEG 20 M trên Chromosorb-W (2m), đầu dò FID.
Khí mang: helium 11 psi (khoảng 25 ml/phút). Hydrogen: 17 psi. không khí: 19 psi.
Nhiệt độ cột: 95°C. Nhiệt độ chích mẫu: 200°C. Nhiệt độ đầu dò: 200°C. Hình a: đẳng nhiệt ở 90°C.
Hình b: chương trình nhiệt độ: 90-50°C với 10°C/phút, giữ lúc khởi đầu 1 phút.

6.2. Lựa chọn nhiệt độ, chương trình nhiệt độ

Về tổng quát, các hợp chất bay hơi nhất (do có áp suất hơi lớn) sẽ là hợp chất nhanh chóng được giải ly ra khỏi cột.

Nếu chỉnh nhiệt độ của cột sắc ký quá cao, các cấu phần của hỗn hợp chưa kịp đạt đến sự cân bằng trong quá trình phân bố giữa hai pha tĩnh và động, hệ quả là tất cả các hợp chất sẽ được giải ly ra khỏi cột cùng một thời điểm (có cùng thời gian lưu). Ngược lại, nếu chỉnh nhiệt độ của cột sắc ký quá thấp, quá trình phân bố của các cấu phần giữa hai pha tĩnh và động sẽ kéo dài, hệ quả là một số cấu phần sẽ có thời gian lưu quá lâu, các tín hiệu mũi của các hợp chất đó bị mất cân đối hoặc bị biến dạng.

Vì thế, cần phải thực hiện nhiều lần sắc ký khí với các nhiệt độ khác nhau để tìm ra được nhiệt độ phù hợp, để tách rời các hợp chất của hỗn hợp một cách tốt nhất. Sắc ký đồ cho thấy rõ các mũi.

Nếu các cấu phần của hỗn hợp có nhiệt độ sôi khác biệt nhau nhiều, nên sử dụng chương trình nhiệt độ để tăng nhiệt độ của lò lên từ từ, tách rời các hợp chất của hỗn hợp một cách tốt nhất.

6.3. Một số vấn đề thường gặp trong quá trình sắc ký khí

Trong quá trình sắc ký khí, thường gặp một số vấn đề như: các tín hiệu mũi trên sắc ký đồ bị biến dạng (không còn đối xứng), kích thước của pic không tương ứng như dự đoán, tín hiệu đường nền bị nhiễu, rối loạn (không còn là một nét sắc rõ), thời gian lưu của cùng hợp chất thay đổi trong những lần phân tích khác nhau (dù cùng điều kiện chạy máy)... Các vấn đề nêu trên có thể do có vấn đề về: chích mẫu vào máy, cột hoặc đầu dò có sự cố.

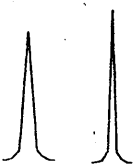
6.3.1. Kích thước của mũi tín hiệu bị giảm

Kích thước của mũi tín hiệu nhỏ hơn so với dự đoán, hoặc so sánh với các quan sát trước đó, bởi vì kỹ thuật viên đã chích vào máy cùng một lượng (hoặc một lượng nhiều hơn) mẫu, điều này là do có vấn đề ở chỗ chích mẫu (tưởng chích nhiều nhưng lượng mẫu vào máy thực tế lại ít) hoặc đầu dò có vấn đề, trở nên kém nhạy, kém hoạt động.

Để khắc phục: kiểm tra xem ống tiêm chích mẫu có bị rò rỉ hoặc hư nghẹt hỏng hóc. Kiểm tra nút ngăn (septum) có bị hư, cũ. Kiểm tra các ống nối, mối nối gắn liền các cột phòng bị vào cột phân tích chính (cột nhỏ gắn phía trước, precolumn, cột gắn phía sau, postcolumn). Kiểm tra đầu dò có bị nhiễm bẩn....

6.3.2. Kích thước của mũi tín hiệu không đối xứng (unsymmetrical peak shape)

Các tín hiệu không đối xứng cho biết có vấn đề ở chích mẫu: đã chích một lượng mẫu quá nhiều so với kích thước đường kính của cột sắc ký; hoặc khoảng thời gian chích mẫu vào máy bị kéo dài quá lâu (thao tác); hoặc kim chích không hoàn toàn xuyên ngang qua nút ngăn (septum).

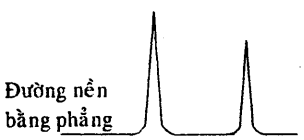


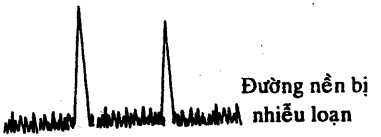
Các tín hiệu mũi đối xứng

Các tín hiệu mũi không đối xứng

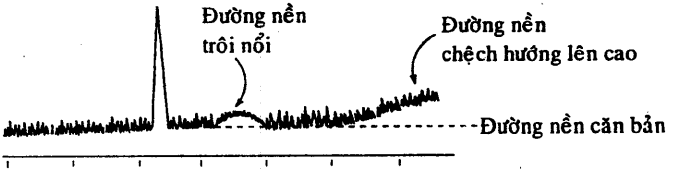
Tín hiệu không đối xứng cũng cho biết hợp chất do tính nhạy cảm với nhiệt và đã bị phân hủy bởi nhiệt khi nó tiếp xúc với các bộ phận của hệ thống máy thí dụ các vách bằng kim loại ở cửa để chích mẫu vào máy, của cột. Điều này cũng có thể là cột hoặc cửa chích mẫu đã bị nhiễm tạp bẩn.

6.3.3. Đường nền không bằng phẳng





Nếu đường nền nhiễu tạp có dạng như những đầu đỉnh không đều, đầu dò bị nhiễm tạp. Mỗi một mũi đỉnh nhọn xuất hiện cho biết có một hạt bụi bẩn đi vào đầu dò. Cũng có thể đầu dò bị nhiễu loạn bởi những xung điện tử của một nguồn khác đặt gần đâu đó. Cũng có thể luồng khí mang bị cản trở đột ngột do bộ phận điều chỉnh dòng chảy, van khoá có sai sót.



Đường nền chệch hướng lên cao (hoặc xuống thấp) là do: cột chưa được cân bằng đầy đủ; khi nhiệt độ đầu dò chưa đạt đến giá trị cân bằng; khi đầu dò bị nhiễm tạp bẩn; khi chương trình nhiệt độ hoạt động ở một khoảng quá lớn.

Một cột mới bắt đầu đưa vào sử dụng cần được cân bằng bằng cách cho máy sắc ký hoạt động suốt đêm ở điều kiện nhiệt độ cao nhất của cột đó.

Các tín hiệu của đầu dò cũng dễ thay đổi theo nhiệt độ, vì vậy cần phải bảo đảm thời gian để nhiệt độ của đầu dò đạt mức ổn định. Sợi tóc đèn của đầu dò dẫn nhiệt (TCD) có thể bị oxid hoá bởi không khí (đầu dò bị rò rỉ).

6.3.4. Sắc ký đồ xuất hiện thêm mũi lạ

Có thể xuất hiện thêm mũi lạ trên sắc ký đồ do một hợp chất của lần phân tích trước đó vì di chuyển chậm nên bị kẹt lại trong cột, vì thế trong lần phân tích sau, hợp chất này được tiếp tục giải ly và ra khỏi cột cùng lúc với các hợp chất của lần phân tích sau.

Chất lạ cũng có thể là tác chất được sử dụng để điều chế chất dẫn xuất; cũng có thể là các tạp bẩn.

Giải pháp là rửa cột kỹ, thay mới nút chặn, kiểm tra đầu lọc của khí mang.

7. CÁC ỨNG DỤNG CỦA SẮC KÝ KHÍ

Sắc ký khí được áp dụng cho nhiều mục đích khác nhau.

* *Để biết được độ tinh khiết* của những hợp chất cần phân tích.

* *Theo dõi phản ứng hoá học*: để biết diễn tiến xảy ra của một phản ứng hoá học, cũng như biết được hiệu quả của việc tinh chế một hợp chất.

* *Biết được số cấu tử hiện diện trong hỗn hợp* mẫu phân tích cũng như biết được tỉ lệ tương đối của mỗi cấu tử trong hỗn hợp. Máy sắc ký khí ghép với khối phổ sẽ giúp biết được cấu trúc của từng cấu tử (tùy vào khả năng của thư viện mẫu).

* *Tìm biết sự hiện diện một chất trong hỗn hợp phân tích*: Trong quá trình muốn biết sự hiện diện một hợp chất X nào đó trong một hỗn hợp mẫu, thực hiện sắc ký khí. Sau đó, nếu có mẫu chuẩn X, thêm X vào trong hỗn hợp mẫu và thực hiện trở lại sắc ký khí với cùng điều kiện thí nghiệm, mũi của X xuất hiện với cường độ cao hơn nhiều so với lần đầu.

Tuy nhiên, công việc sẽ khó khăn hơn nhiều trong trường hợp mẫu phức tạp, chứa nhiều cấu phần. Việc giải đoán kết quả có thể sai, bởi những lý do như sau:

- Một hoặc nhiều cấu phần của hỗn hợp có thể bị phân hủy trong cột.

- Một mảnh của pha tĩnh có thể bị hư hại hoặc bay hơi.

- Các mũi của lần phân tích trước, do để thời gian chưa đủ lâu, nên còn sót lại cho lần phân tích này.

- Các hợp chất có thời gian lưu tình cờ trùng với thời gian lưu của mẫu chứng.

✳ *Để phân tích thực phẩm*: Việc phân tích thực phẩm bao gồm các khảo sát tìm hiểu về lipid, protein, carbohydrat, các chất bảo quản, các chất mùi, màu, các gia chất ngoài ra còn có các vitamin, steroid, thuốc chữa bệnh, dư lượng thuốc trừ sâu, các vết kim loại... Phần lớn các hợp chất nói trên đều không có tính bay hơi và ngày nay người ta thường sử dụng HPLC để phân tích thực phẩm. Tuy vậy, sắc ký khí vẫn còn thường được sử dụng trong việc phân tích thực phẩm.

Muốn có thể phân tích bằng sắc ký khí, các loại hợp chất nói trên được thực hiện phản ứng hoá học như sau: các lipid, các acid béo được chuyển thành dẫn xuất metyl ester. Các protein được thủy giải bằng dung dịch acid, tiếp theo đó được ester hóa thành *N*-propyl ester. Các carbohydrat được silyl hoá để biến thành chất dẫn xuất có tính bay hơi.

Nhờ việc biến đổi như thế, các công ty xí nghiệp vẫn thường sử dụng GC để thường xuyên phân tích các mẫu sản phẩm.

Trái cây, rau quả, nước uống nhẹ, trà, cà phê... được kiểm tra hàm lượng các hợp chất hydroxyacid, các hợp chất tính kiềm (acid citric, acid maleic...) sau khi đã chuyển các hợp chất thành chất dẫn xuất TMS, rồi sử dụng cột OV17 hoặc các cột tương đương. Các flavonol, cafein được phân tích trên OV 101. Các hợp chất bay hơi có chứa nhóm chức carbonyl (vanillin) sử dụng cột phân cực Carbowax 20 M.

✳ *Để phân tích thuốc uống.*

Sử dụng GC để phân tích thuốc uống cũng là một phương tiện bên cạnh việc sử dụng HPLC.

Tuỳ theo tính chất bay hơi của mẫu cần phân tích, một số mẫu thuốc có thể được phân tích trực tiếp bằng GC ngay sau công đoạn chiết tách, hoặc hoà tan mẫu thuốc vào dung môi phù hợp, hoặc phải điều chế chất dẫn xuất trước khi phân tích GC.

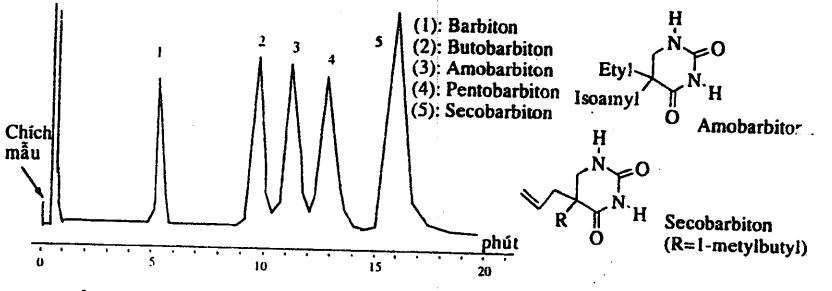
✳ *Để phân tích môi trường.*

Sử dụng GC đã được áp dụng rộng rãi để khảo sát các vấn đề về ô nhiễm môi trường như bụi từ khí thải của nhiên liệu, xử lý các vụ mùa với thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ, các phế liệu, chất thải...

Cơ quan bảo vệ môi trường Hoa Kỳ và Hội đồng Âu châu đã đề xuất các phương pháp chuẩn để phân tích các chất ô nhiễm trong nước sinh hoạt và nước thải. Các phương pháp này gồm cả việc phân tích các loại chất gây ô nhiễm với khoảng 40 hợp chất có chứa clor, 40 hợp chất hữu cơ-phosphor và 7 carbamat. Qui trình thực hiện là chất cần phân tích được chiết tách bằng diclorometan, làm đậm đặc dung dịch này và phân tích bằng cột BP 17 hoặc OV 17, với đầu dò ECD cho loại hợp chất chứa clor và với đầu dò FPD cho hợp chất hữu cơ-phosphor. Các carbamat được chuyển thành chất dẫn xuất 2,4-diphenyleter trước khi phân tích.

Thí dụ xác định hàm lượng barbiturat, sử dụng chất nội chuẩn

Tổng quan: Barbiturat là loại thuốc có hoạt tính làm giảm sự hoạt động của hệ thần kinh trung ương. Các dẫn xuất của nó thường hay gặp trong các loại thuốc ngủ mà những người tự tử thường hay sử dụng, vì thế ngành y cần có phương pháp để xác định chính xác hàm lượng barbiturat trong các loại dung dịch sinh lý trong trường hợp sử dụng loại thuốc này quá liều.



Hình 17: Phổ đồ GC một chất chuẩn gồm hỗn hợp các loại barbiturat, với các điều kiện ghi trong bài

Nguyên vật liệu: Dung dịch: 0,2% (w/v) barbiton trong nước (internal standard, IS).

Các chất chuẩn barbiturat: Butobarbiton, amobarbiton, pentobarbiton, secobarbiton.

Các mẫu cần phân tích: chứa hai hoặc nhiều các loại barbiturat nói trên.

Cột: 10% Apiezon L trên DMCS chromosorb W. Đầu dò: FID.

Phương pháp

Máy Hewlett Packard 5890 Series II. Khí mang: nitrogen, 12 psi (1 psi # 6,9 kPa).

Hydrogen: 20 psi. Nhiệt độ cột: 210°C. Nhiệt độ chích mẫu: 210°C. Nhiệt độ đầu dò: 225°C

Barbiturat dễ dàng gắn dính vào thủy tinh và cột bằng thủy tinh, vì thế, trước khi phân tích, các dụng cụ bằng thủy tinh cần được silan hoá bằng dimetyldiclorosilan. Silan sẽ xuất hiện tại vị trí của mũi của dung môi.

Chuẩn bị các dung dịch để sắc ký khí:

* Dung dịch chuẩn barbiton: *x* mg barbiton/ 50 ml etanol

* Chuẩn bị các dung dịch: butobarbiton, amobarbiton, pentobarbiton, secobarbiton với chất nội chuẩn barbiton, mỗi loại trong 1 erlen riêng biệt: cho vào mỗi lọ một loại barbiturat (50 mg), rót một ít etanol vào để hoà tan, rót thêm vào dung dịch này 50 ml dung dịch chuẩn barbiton, cho thêm etanol để đạt thể tích cuối cùng là 100 ml. Có các dung dịch lần lượt là A, B, C và D.

* Dung dịch có chứa barbiturat nhưng chưa biết chứa barbiturat nào và có nồng độ bao nhiêu.

Sử dụng các dung dịch A, B, C và D chích mẫu vào máy sắc ký khí để biết thời gian lưu của mỗi loại barbiturat, so với vị trí của barbiton. Mỗi lần chích 1µl, mỗi loại thực hiện 2 lần.

Chích mẫu chưa biết. Sử dụng dữ liệu này để xác định loại barbiturat và nồng độ của nó trong dung dịch mẫu chưa biết.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. **A. Braithwaite, F.J. Smith.** *Chromatographic methods.* Kluwer Academic Publishers. Boston-London, 45-501, 1999.

[2]. **Donald L. Pavia, Gary M. Lampman, George S. Kriz.** *Introduction to laboratory techniques.* A contemporary approach. Harcourt Brace College Publishers, Sydney, London, Tokyo. 600, 1988.

[3]. **John Kenkel.** *Analytical chemistry for technicians.* CRC Press LLC. Florida. 2003

[4]. **Richard J.P. Cannell.** *Natural Products Isolation.* Humana Press, Totowa- New Jersey, 20-212, 1998.

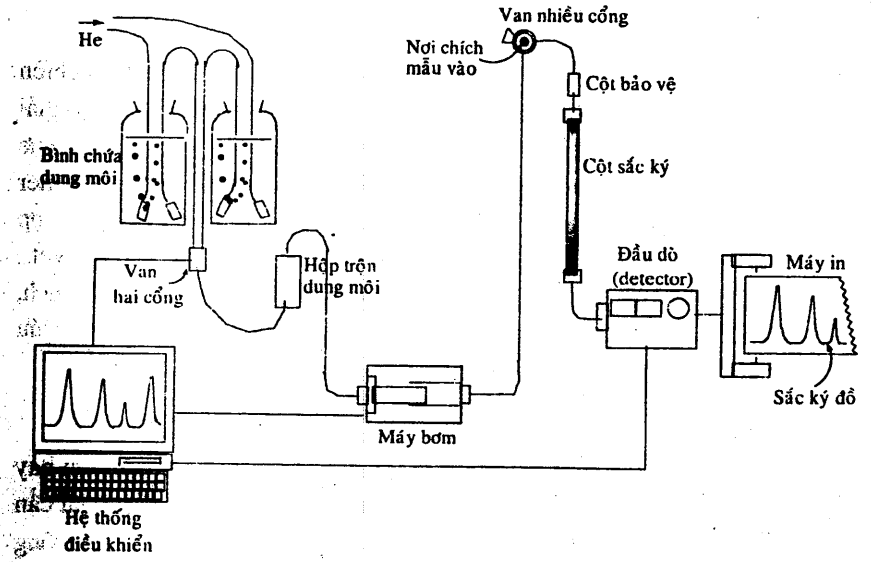
CÁC PHƯƠNG PHÁP CÔ LẬP HỢP CHẤT HỮU CƠ

Chương 8

SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)

Các nghiên cứu về nguyên tắc của máy sắc ký khí đã được hai tác giả Martin A.J.P. và Synge R.L.M. đề xuất từ năm 1950. Đến năm 1955, máy được sản xuất để bán ra thị trường và cũng từ đó máy càng được hoàn thiện để đến thập niên 1980 các thiết bị của loại máy đạt mức độ hoàn hảo.

Tuy nhiên, điều kiện tiên quyết để một hỗn hợp có thể được phân tích bằng kỹ thuật sắc ký khí là mỗi cấu tử của hỗn hợp phải có áp suất hơi phù hợp với nhiệt độ hoạt động của cột sắc ký.



Hình 1: Mô tả tổng quát các bộ phận của máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Để khắc phục các khó khăn về yêu cầu mẫu khảo sát phải có tính bay hơi mới có thể phân tích bằng sắc ký khí, người ta thực hiện phản ứng hoá học để biến đổi các hợp chất kém hoặc không bay hơi, thành các chất dẫn xuất có tính bay hơi. Tuy nhiên, việc điều chế mẫu thành các chất dẫn xuất vẫn còn nhiều vấn đề khó giải quyết như sau:

- Các phản ứng điều chế chất dẫn xuất khó xảy ra hoàn toàn, đưa đến sự sai lệch trong việc *xác định hàm lượng* mẫu chất cần phân tích.

- Phản ứng có thể tạo thành những dẫn xuất khác nhau.

- Một số lớn các loại hợp chất, dù đã được chuyển đổi thành chất dẫn xuất, nhưng khi được đun nóng, vẫn không thể bay hơi, mà còn bị nhiệt hủy hoại, thí dụ các loại dược phẩm, polymer, protein, phẩm nhuộm....

Việc cần thiết phân tích các hợp chất là nhu cầu bức thiết trong cuộc sống, nhưng trong các hợp chất đã được biết, chỉ có khoảng 20% là phù hợp cho việc phân tích bằng sắc ký khí. Để có thể đáp ứng cho yều cầu nói trên, kỹ thuật sắc ký lỏng (liquid chromatography, LC) được phát triển, hoàn thiện để có được kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography, HPLC).

Năm 1967, Horvath C. là tác giả đầu tiên đã tạo máy HPLC để nghiên cứu về nucleotid. Ngày nay, với các ưu điểm như áp suất cao, độ phân giải cao, vận tốc sắc ký nhanh... HPLC được áp dụng trong rất nhiều lĩnh vực nghiên cứu đa dạng như phân tích dược phẩm, các dung dịch sinh lý, polymer thiên nhiên hoặc tổng hợp, các loại dư lượng trong môi trường, nhiều loại hợp chất vô cơ, các loại nguyên tố hiện diện trong mẫu phân tích ở dạng vết... Hơn nữa, các loại đầu dò dùng cho HPLC không làm hư hại mẫu phân tích, nên sau khi phân tích, có thể thu hồi mẫu để thực hiện các loại nghiên cứu khác như phân tích phổ, thử nghiệm hoạt tính sinh học...

Hai kỹ thuật GC và HPLC có những khác biệt như sau:

• *Về tính chất của mẫu phân tích*: trong GC, mẫu cần phải có tính bay hơi và bền nhiệt, còn HPLC không có giới hạn về tính chất của hợp chất cần phân tích: hợp chất có trọng lượng phân tử lớn (polymer), hợp chất không

phân cực, hợp chất rất phân cực, hợp chất ion, hợp chất kém bền nhiệt, hợp chất có tính bay hơi...

• *Về cơ chế tách chất*: trong GC, khả năng tách chất dựa vào *áp suất hơi của các cấu tử* trong hỗn hợp, mà không phải là sự tương tác của các cấu tử của hỗn hợp với khí mang. Trong HPLC, khả năng tách chất dựa vào *sự tương tác của các cấu tử* của hỗn hợp với các thành phần của pha động lỏng.

• *Về lực duy trì dòng chảy của pha động*: trong GC, là một bơm áp lực cao, còn trong HPLC, là máy nén hơi tạo áp suất cao, có thể điều chỉnh vận tốc dòng chảy.

• *Về bộ phận để đưa mẫu vào máy*: máy GC và HPLC cần một thiết bị chế tạo đặc biệt vì phải đưa mẫu từ bên ngoài đang ở áp suất thường vào bên trong máy đang ở áp suất cao và hơn nữa pha động lỏng của HPLC có thể làm hư hại nút ngăn làm bằng cao su.

• *Về đầu dò*: máy GC cần loại đầu dò thiết kế riêng vì pha động ở thể khí.

• *Về nhiệt độ hoạt động của máy*: trong GC, các bộ phận thiết bị của máy: bộ phận chích mẫu, cột, đầu dò đều phải được đun nóng, còn HPLC hoạt động ở nhiệt độ phòng.

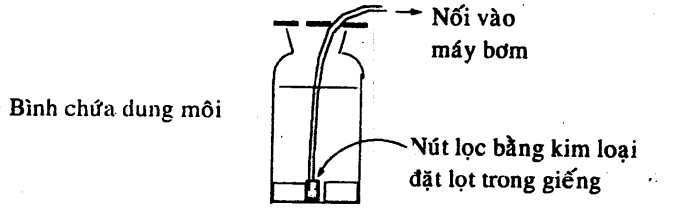
1. CÁC BỘ PHẬN CỦA MÁY HPLC

Hình 1 mô tả tổng quát các bộ phận của máy HPLC.

1.1. Bình chứa dung môi giải ly cột

Hệ dung môi giải ly cột được được hút ra từ hai bình chứa dung môi. Bình được làm bằng chất liệu trơ, thường là bằng thủy tinh. Bình luôn luôn có một cái nắp bảo vệ để không cho bụi rơi vào trong bình, nắp có lỗ hở để bình luôn thông với khí trời. Trong bình, có một ống dẫn dung môi từ bình vào ống sắc ký, ở đầu này có gắn một nút lọc bằng kim loại với mục đích lọc dung môi và cũng để giữ ống luôn ở dưới mặt thoáng của chất lỏng. Các nhà sản xuất có những bình chuyên dùng để cho nút lọc bằng kim loại nói trên lọt vào một lỗ giếng, bảo đảm đầu ống luôn chạm sát đáy bình, có thể sử dụng đến giọt dung môi cuối cùng trong bình.

Trước khí lắp một bình dung môi vào vị trí hoạt động, cần phải loại bỏ phần không khí đã hoà tan vào dung môi trước đó, gọi là khử bọt khí (degassing), bởi vì nếu còn lẫn những bọt không khí vào trong luồng dung môi đi vào máy sẽ làm cho máy bơm và đầu dò hoạt động kém hiệu quả.



Hình 1

Dung môi dùng cho HPLC

Máy HPLC thường sử dụng hỗn hợp hai loại dung môi, tuy vậy cũng có những nghiên cứu sử dụng bốn loại dung môi, trong trường hợp này, cần có thêm thiết bị phụ trợ thích hợp có bán sẵn. Tỉ lệ của mỗi dung môi trong hỗn hợp được điều khiển bằng hệ thống điều khiển. Máy bơm hút hai dung môi trong hai bình, đưa vào hộp phối trộn.

Có hai kiểu sử dụng pha động trong việc giải ly: giải ly đơn nồng độ (isocratic elution) và giải ly nồng độ tăng dần tuyến tính (gradient elution).

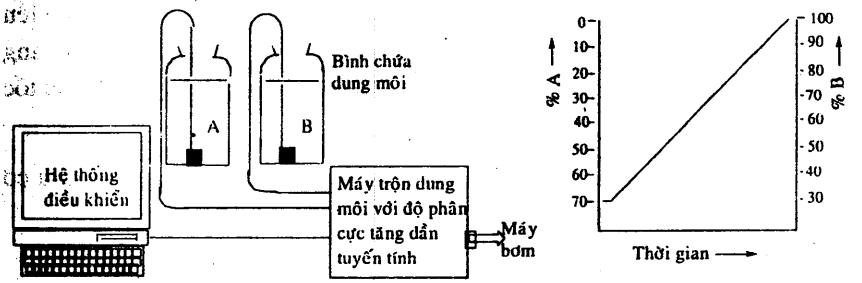
* Giải ly đơn nồng độ: với một pha động lựa chọn (một dung môi hoặc hỗn hợp hai dung môi với tỉ lệ xác định) được sử dụng suốt quá trình sắc ký cột. Muốn thay đổi qua một loại pha động khác, phải ngưng quá trình sắc ký, thay bình chứa dung môi, cho pha động hoạt động trở lại.

* Giải ly nồng độ tăng dần tuyến tính: trong quá trình sắc ký, tính phân cực của pha động được thiết kế để tăng dần lên từ từ đều đặn, tương tự như sắc ký khí, nhiệt độ của cột phân tích được chỉnh tăng dần lên.

Trong sắc ký lỏng, tính phân cực của pha động giữ vai trò quan trọng trong việc tách chất. Việc điều chỉnh pha động để có tính phân cực tăng dần tuyến tính được thực hiện bởi một máy trộn dung môi, điều khiển bởi hệ điều hành của máy. Kỹ thuật viên chỉ cần đánh lệnh vào máy tính, với chương trình mong muốn (Hình 3).

Dung môi dùng cho HPLC có thể là nước, các loại dung dịch đệm (pha trong nước), metanol, acetonitril hoặc hỗn hợp của các loại trên. Nếu máy sử dụng đầu dò UV, dung môi sử dụng phải trong suốt đối với bước sóng mà đầu dò UV đang hoạt động để phát hiện mẫu chất.

Tất cả dung môi phải có độ tinh khiết cao, đạt tiêu chuẩn HPLC (HPLC grade solvent), không có lẫn bụi bẩn, trước khi gắn vào máy HPLC, dung môi phải được khử không khí. Có thể khử khí bằng cách cho một luồng khí helium xục mạnh vào bình với vận tốc 300 ml/phút trong vài phút, bong bóng khí helium sẽ đuổi bọt không khí ra khỏi bình. Dung môi bão hòa khí helium không làm ảnh hưởng gì đến quá trình sắc ký. Cũng có thể khử khí bằng cách đặt bình, đã được mở nắp, vào một bồn siêu âm và cho máy hoạt động trong 5-10 phút.



Hình 2: Mô tả máy trộn dung môi với độ phân cực tăng dần như sơ đồ minh họa

Bảng 1: Một số dung môi và tính chất của chúng.

Tên dung môi	Nhiệt độ sôi (°C)	Độ nhớt ($mN.S.m^{-2}$)	Bước sóng hấp thu UV (nm)
Pentan	36	0,24	210
Cyclohexan	69	0,98	210
Tetraclorur carbon	77	0,97	265
Toluen	111	0,59	286
Dietyl eter	35	0,25	218
Cloroform	62	0,57	245
Diclorometan	40	0,44	235
Tetrahydrofuran	66	0,55	220

2-Butanon	80	0,32	330
Aceton	56	0,32	330
1,4-Dioxan	107	1,44	215
Etyl acetat	77	0,45	255
Dietylamin	115	0,33	275
Acetonitril	82	0,37	190
2-Propanol	82	2,50	210
Etanol	78	1,20	210
Metanol	64	0,59	210
Nước	100	1,0	-

1.2. Máy bơm

Loại bơm của máy HPLC là loại bơm đặc biệt với áp suất rất cao lên đến 7.000 psi (48,3 MPa) để bơm một dung môi (pha động) đi xuyên ngang qua một pha tĩnh (được nhồi thật chặt bởi những hạt thật mịn) với một vận tốc không đổi, thường vào khoảng 0,5–4,0 ml/ phút.

Bơm được cấu tạo bằng chất liệu để chịu đựng được dung môi hữu cơ và các dung dịch đệm.

1.3. Cột sắc ký (và cột bảo vệ)

Cột HPLC được làm bằng thép không gỉ, thường dài 10–25 cm và có đường kính bên trong 2,1–4,6 mm. Cột sắc ký được nhồi thật chặt bởi những hạt nhỏ đường kính ≤ 5 µm, đạt tiêu chuẩn >10.000 mâm lý thuyết/mét.

Trước khi pha động đi vào cột phân tích, nó phải được cho đi ngang một cột bảo vệ (guard column), sử dụng để lọc bỏ những chất tạp bẩn còn sót lại.

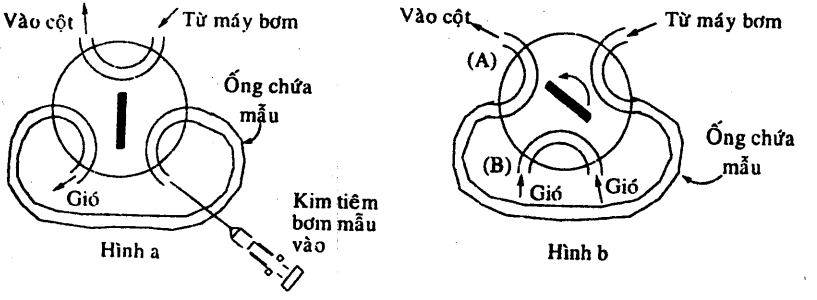
Cột bảo vệ không đắt tiền nên cần được thay mới thường xuyên.

1.4. Bộ phận chích mẫu vào máy

Cho mẫu vào một pha động ở vị trí trên đầu cột là một vấn đề kỹ thuật của máy HPLC vì lúc đó hệ thống đang ở áp suất cao, hơn nữa, pha động lỏng có thể làm hư hại nút ngăn làm bằng cao su.

Máy HPLC có hệ thống chích mẫu đặc biệt: ống chứa mẫu (sample loop), là van có hai cổng, giúp định hướng dòng chảy của pha động chỉ có thể đi trên một trong hai con đường khác nhau. Khi máy đang hoạt động đều, pha động lỏng đi xuyên ngang qua cột sắc ký nhờ một máy bơm tạo áp suất cao.

Mẫu khảo sát (ở bên ngoài máy, áp suất thường), được chích vào máy nhờ vào một kim tiêm (Hình 3a). Gạt van theo chiều qui định (hình 3b), ống chứa mẫu được nối thông vào bên trong máy, pha động lỏng thổi ngang qua đoạn ống chứa mẫu, cuốn hết các chất mẫu nằm trong ống đi vào trong máy. Trong khi con đường (A) hoạt động thì đường (B) thông ra không khí bên ngoài máy, được khí thổi sạch để sẵn sàng chứa một mẫu mới cho lần phân tích sau.



Hình 3: Ống chứa mẫu trong HPLC

Hình a: Vị trí van khi chích mẫu vào bộ phận chích mẫu. Mẫu được bơm vào cuộn chứa mẫu nhờ một kim tiêm, ở áp suất thường.

Hình b: Vị trí van khi muốn đưa mẫu vào bên trong máy, pha động thổi ngang qua cuộn chích mẫu, lôi cuốn những chất ở trong cuộn để đưa vào trong máy.

1.5. Đầu dò (Có mục trình bày riêng)

2. CÁC LOẠI PHA TĨNH ĐỂ NHỒI CỘT SẮC KÝ HPLC

Cũng giống như cột sắc ký khí, có nhiều loại pha tĩnh để nhồi cột HPLC, tuy nhiên với HPLC lại đa dạng hơn. Tất cả các kỹ thuật sắc ký đều có cột HPLC: cột pha thường (normal phase column), cột pha tạo nối (bonded phase), cột pha đảo (reverse phase), cột trao đổi ion (ion exchange column), cột sắc ký gel (size exclusion column)...

Các loại nguyên liệu dùng để nhồi cột sắc ký HPLC là những hạt có lỗ rỗng siêu nhỏ (microporous particle) với kích thước, dạng và độ rỗng khác nhau. Phần lớn các nguyên liệu là silica, là những hạt có kích thước nhỏ, có diện tích bề mặt lớn (200-300 m^2/g) và chịu đựng được áp suất tương đối cao. Các loại nguyên liệu khác có thể là alumin, zirconium, nguyên liệu trao đổi ion...

Bảng 2: Các loại cột HPLC dùng trong các kỹ thuật sắc ký khác nhau

Loại cột	Tính chất của hợp chất có thể phân tích
Cột pha thường, pha đảo, pha tạo nối	Có trọng lượng phân tử nhỏ (< 2.000). Không có mang điện tích. Có thể có tính phân cực hoặc không. Có thể hoà tan trong dung môi hữu cơ hoặc nước.
Cột trao đổi ion	Có trọng lượng phân tử nhỏ (< 2.000). Phân tử có mang điện tích. Loại hợp chất hoà tan trong nước.
Cột sắc ký gel	Có trọng lượng phân tử nhỏ hoặc lớn. Không có mang điện tích. Có thể hoà tan trong dung môi hữu cơ hoặc nước.

2.1. Pha thường (Normal phase)

HPLC pha thường, còn được xem là kỹ thuật sắc ký hấp thu, là phương pháp sử dụng một pha động không phân cực, kết hợp với một pha tĩnh phân cực. Cơ chế tách chất dựa vào việc phân bố của các phân tử chất tan giữa dung dịch và sự hấp thu lên trên bề mặt của pha tĩnh. Nguyên liệu dùng cho kỹ thuật sắc ký rắn-lỏng này là silica gel, alumin và graphit.. trong đó silica được sử dụng nhiều nhất, vì nó có lớp bề mặt mang nhiều nhóm silanol rất hoạt tính. Cơ chế hấp thu là sự tương tác giữa nhóm silanol của silica gel với các nhóm chức phân cực của phân tử chất tan (nhóm alcol, amin, ceton, acid carboxylic).

Sắc ký hấp thu tách tốt các hợp chất có tính không phân cực hoặc phân cực vừa phải, giải ly nhờ sử dụng loại dung môi khá phân cực. Kỹ thuật này không phù hợp lắm với loại dung môi rất phân cực.

Các hợp chất có mang nhóm chức phân cực sẽ tương tác với nhóm hoạt động bề mặt silanol của silica gel. Các hợp chất càng có tính phân cực càng bị hấp thu mạnh, vì thế sắc ký rắn-lỏng phù hợp để tách hỗn hợp gồm nhiều hợp chất có tính phân cực khác nhau. Kỹ thuật này không phù hợp với các loại hợp chất tan kém trong dung môi, như hợp chất thơm đa nhân, dầu béo hoặc các hợp chất trong một dãy đồng đẳng.

Kỹ thuật sắc ký lỏng-lỏng được phát triển từ một nghiên cứu đạt giải Nobel của Mertin và Synge vào năm 1941. Sắc ký lỏng-lỏng bao gồm một pha động lỏng và một pha tĩnh lỏng; pha tĩnh này gồm một chất lỏng *được cho bao phủ lên trên* một giá mang (support) nhờ vào một lực vật lý, đó là sự hấp thu. Để tránh việc dung môi bị trôi tuột khỏi giá mang, dung môi giải ly phải được bão hòa với các thành phần của pha tĩnh. Pha động và pha tĩnh cần phải có độ phân cực khác hẳn nhau và hỗn hòa vào nhau.

Tuy rằng kỹ thuật nói trên đã được sử dụng nhiều trong quá khứ, nhưng ngày nay, kỹ thuật sắc ký sử dụng pha tạo nối được ưu chuộng vì có nhiều ưu điểm: có thể tái sử dụng lại pha tĩnh; có nhiều loại chất lỏng tương thích để làm pha tĩnh, cho kết quả tách chất hiệu quả hơn....

Sắc ký lỏng-lỏng có thể phân loại thành sắc ký lỏng-lỏng pha thường và sắc ký lỏng-lỏng pha đảo. Loại sắc ký lỏng-lỏng pha thường rất bền nhờ sự tạo nối mạnh mẽ giữa pha tĩnh và giá mang. Tuy nhiên, hệ thống gồm những cặp không hỗn hoà vào nhau, thí dụ như isopropanol/ hexan, có nhiều bất lợi vì với các thành phần của mẫu phân tích chỉ cần một sự khác biệt nhỏ, hệ số phân bố hoặc là rất nhỏ hoặc là rất lớn. Với hệ thống pha đảo, thí dụ như squalan /nước /alcol, dung môi giải ly phải bão hòa với pha tĩnh squalan, dung môi mới không trôi tuột ra khỏi giá mang.

Các điểm bất tiện chính của sắc ký lỏng-lỏng là dung môi giải ly phải bão hòa với pha tĩnh nên không thể áp dụng kỹ thuật giải ly với dung môi có độ phân cực tăng dần, phải duy trì pha tĩnh ở nhiệt độ không được thay đổi quá nhiều, chỉ khoảng ± 0,5°C.

2.2. Pha tạo nối (bonded phase)

Từ những bất tiện trình bày ở trên, pha tĩnh tạo nối bằng hoá học (chemically bonded stationary phase) đã được phát triển, dựa vào các hạt silica đường kính 3, 5 và 10 µm. Giá mang silica có nhiều lỗ rỗng, có hạt hình cầu hoặc có hình dạng bề ngoài không đều.

Ưu điểm:

✳ Các loại phân tử phân cực, không phân cực, loại ion, loại có khả năng ion hóa... đều có thể tách chỉ bởi một cột sắc ký và với pha động phù hợp.

✳ Có thể chế tạo nhiều loại pha tĩnh với độ phân cực khác nhau.

✳ Có thể lựa chọn nhiều loại dung môi giải ly.

✳ Dung môi giải ly chủ lực là nước kết hợp với những dung môi hữu cơ như metanol, acetonitril là những loại dung môi luôn dễ kiếm, có giá cả phù hợp.

✳ Có thể áp dụng kỹ thuật giải ly với dung môi có độ phân cực tăng dần mà không làm hư hại pha tĩnh (lớp dung môi bọc bên ngoài trôi tuột khỏi giá mang).

✳ Hệ thống đạt sự cân bằng nhanh và không để lại các hệ quả xấu.

Nhược điểm: dung môi chỉ nên ở khoảng pH 2,0–8,5, vượt quá khoảng này, pha tĩnh bị đứt nối hoặc bị thủy giải. Không thể sử dụng các dung môi có tính oxid hoá.

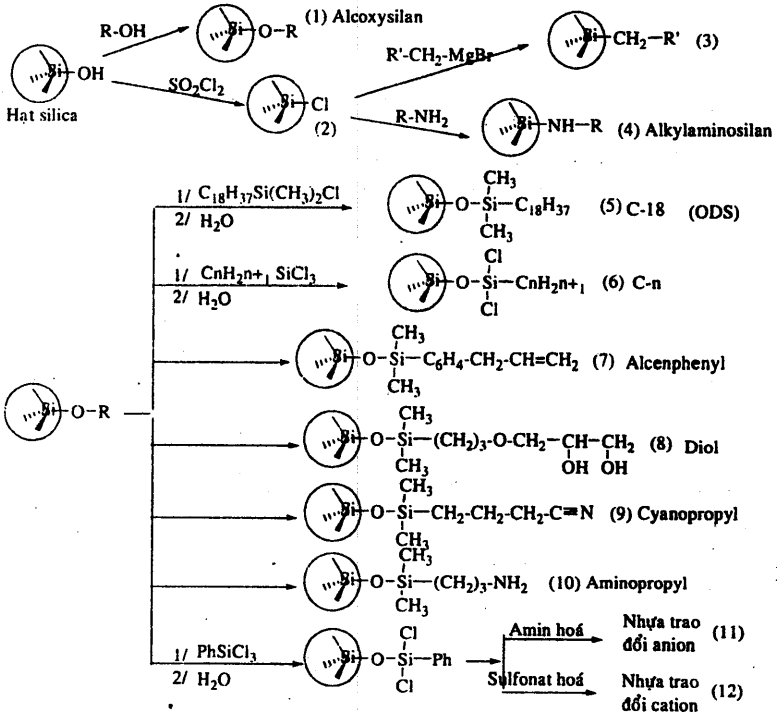
Điều chế pha tạo nối bằng cách biến đổi các nhóm silanol bề mặt thành các nhóm dẫn xuất. Có các loại pha tạo nối như sau:

- Các nhóm alkyl như octadecyl ($C_{18}H_{37}$), ngoài ra còn một số nhóm khác với dây carbon ngắn hơn như C_1, C_2, C_8 và aryl.
- Các nhóm phân cực như amino, cyanopropyl, eter, diol.
- Các nhóm trao đổi ion như acid sulfonic, amino, ammonium tứ cấp.

2.2.1. Nguyên liệu tổng hợp pha tạo nối

Bảng 3 trình bày một số loại pha tĩnh có bán trên thị trường với tên thương mại, mạch carbon dài ngắn khác nhau.

Hình 4 trình bày sơ đồ các loại phản ứng để điều chế các loại pha tĩnh tạo nối khác nhau. Các pha tĩnh tạo nối thương mại có 40-60% các nhóm silanol được biến đổi thành các dẫn xuất. Các pha tĩnh này chịu được áp suất dòng chảy của pha động ở 6.000 psi (41,4 MPa) trong khoảng pH 2,0–8,5.



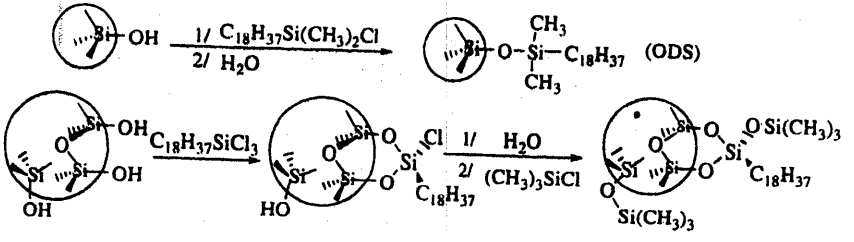
Hình 4: Sơ đồ biểu diễn các phản ứng điều chế các loại pha tĩnh tạo nối khác nhau

Trong phản ứng điều chế ra các loại pha tĩnh tạo nối, giai đoạn thông dụng nhất là sử dụng clorur tionyl để biến nhóm silanol thành clorosilan (chất 2 hình 4). Tiếp đó, có thể gắn các nhóm chức hữu cơ vào silica bằng các dẫn xuất Grignard hoặc organolitium, hoặc cho nhóm clorosilan tác dụng với amin để tạo nên alkylaminosilan (chất 4 hình 4).

Nguyên liệu của pha tạo nối được sử dụng nhiều nhất là những nguyên liệu được tạo thành bằng cách cho nhóm silanol bề mặt tác dụng với organoclorosilan giúp nối pha tĩnh vào chất mang, ngang qua nối siloxan (Si-O-Si). Thí dụ với pha tạo nối ODS ($C_{18}H_{37}Si$–), tác chất sử dụng là octadecylclorosilan (chất 5 hình 4).

Nếu silan chỉ nối với duy nhất một nhóm clor, phản ứng sẽ tạo ra một pha tĩnh mang những nhóm dimetylsilan một cách đồng đều (Hình 5, phản ứng ở trên) và pha tĩnh như thế sẽ bị che phủ ở lớp mặt (surface loading) bởi khoảng 8-12 % carbon. Tuy vậy, trên bề mặt silica, vẫn còn lại khoảng vài mươi phần trăm các nhóm silanol tự do, các nhóm này tạo ra hiện tượng mũi tín hiệu bị kéo đuôi trên sắc ký đồ. Để khắc phục hiện tượng này, cho tác dụng với clorur trimetylsilyl, $(CH_3)_3SiCl$, các nhóm silanol tự do còn sót lại sẽ bị khoá chết, còn được gọi là được "che phủ đầu" (end-capping). Với một pha tĩnh có sự "che phủ đầu" (end-capping), lượng che phủ bề mặt tăng thêm 1-2% carbon.

Nếu sử dụng diclorosilan hoặc triclorosilan, nghĩa là Si nối với hai hoặc ba nhóm clor, sẽ có phản ứng tạo nối ngang (cross-linking) tạo nên một pha tĩnh có mức độ tạo nối không thể xác định được. Vì thế, người ta thực hiện phản ứng thủy giải các nhóm clor còn sót lại, cho tác dụng với trimetylclorosilan để tạo một nguyên liệu mà phần nền lõi bên trong là silica và phủ lên nền này là một lớp dầy, đậm đặc, có khoảng 15-25% carbon (Hình 5, phản ứng ở dưới).



Hình 5: Phản ứng của silica với octadecyltriclorosilan và hệ quả là các nhóm silanol còn sót lại đã được "che phủ đầu" (end-capping)

2.2.2. Cơ chế bắt giữ chất của pha tạo nối

Cơ chế bắt giữ chất của pha tạo nối rất phức tạp, theo nhiều cơ chế khác nhau và chưa được hiểu rõ. Có thể hiểu nó có tính chất tương tự như sự phân bố trong hệ thống pha lỏng-lỏng và cũng có thể hiểu là có một sự tranh dành giữa dung môi giải ly và các phân tử chất tan để chiếm lấy một "vị trí" trên pha tĩnh.

Các nhóm silanol còn sót lại trên bề mặt của hạt silica có thể gây hiệu ứng hấp thu, khiến cho có hiện tượng tín hiệu mũi trên sắc ký đồ kéo đuôi, tạo vệt dài. Vì lý do này, nên sử dụng loại pha tĩnh có hàm lượng pha tĩnh che phủ cao, hoặc loại có nhóm silanol tự do đã được che phủ đầu.

Lượng carbon che phủ không có ý nghĩa nhiều bằng phần trăm bề mặt silica được che phủ vì nó ảnh hưởng đến khả năng giữ chất, tính chất hoá học, độ bền về pH của pha tĩnh. Trong thực tế, các nguyên liệu pha tĩnh tạo nối của các hãng sản xuất có sự khác biệt nhau đáng kể về khả năng tách chất, về sự phù hợp để tách một loại hợp chất hữu cơ cụ thể nào đó... đều căn cứ vào qui trình điều chế pha tĩnh với mức độ tạo phủ khác nhau.

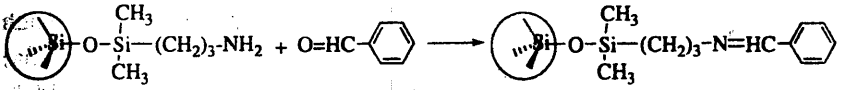
Bảng 3: Một số loại pha tĩnh có bán trên thị trường.

Tên thương mại	Pha tĩnh	Kích thước lỗ (Å)	Thể tích lỗ (ml/g)	Diện tích bề mặt (m^2/g)	Lượng carbon (%)	Pha tĩnh che phủ ($\mu mol/m^2$)	Che phủ đầu
Hypersil SAS	C_1	120	0,7	170	3,0	5,29	Không
Spherisorb	C_1	80	0,5	220	4,0	1,08	Một phần
Ultremex	C_1	80	0,8	200	3,0	4,5	Không
Ultremex	C_2	80	0,8	200	3,0	4,5	Có
Hypersil	C_4	300	0,6	50	2,0	4,8	Có
Nucleosil	C_4	120	0,65	200	-	-	Có
Nucleosil 300	C_4	300	0,8	100	1,0	1,41	Có
Nucleosil 500	C_4	500	0,8	35	1,0	4,04	Có
Nucleosil 1000	C_4	1.000	0,85	25	1,0	5,66	Có
Nucleosil 4000	C_4	4.000	0,7	10	< 1,0	-	Có
Spherisorb	C_6	80	0,5	220	6,0	2,51	Có
Ultremex	C_6	80	0,8	200	13,0	3,29	Có

Hypersil	C_8	300	0,6	50	3,0	5,24	Có
Hypersil Mos 1	C_8	120	0,7	170	7,0	3,85	Không
Nucleosil 100	C_8	100	1,0	350	9,0	2,49	Không
Nucleosil 500	C_8	500	0,8	35	1,0	2,42	Không
Hypersil	C_{18}	120	0,7	170	10,0	2,84	Có
Nucleosil 1000	C_{18}	1.000	0,85	25	1,0	1,69	Có
Kromasil	C_{18}	100	0,9	340	19,0	3,1	Có
Nucleosil 100	Phenyl	100	1,0	350	8,0	1,96	Không
Spherisorb	Phenyl	80	0,5	220	3,0	1,08	Một phần
Selectosil	Phenyl	110	1,1	330	8,0	2,08	Không
Spherisorb	CN	80	0,5	220	3,5	2,37	Không
Hypersil CPS2	CN	120	0,7	170	4,0	3,55	Có
Iltremex	CN	80	0,8	200	2,5	1,83	Không
Zorbax	CN	70	-	330	5,0	2,41	Có
Spherisorb	NH_2	80	0,5	220	2,0	1,58	Không
Selectosil	NH_2	110	1,1	330	3,3	1,8	Không
Nucleosil 100	Diol	100	1,0	350	0	-	Không
Spherex	Diol	100	0,8	180	2,0	1,37	Không
Hypersil SAX	Anion	120	0,7	170	2,7	1,56	Có
Selectosil	Anion	110	1,1	330	1 meq/g	-	Không
Selectosil	Cation	110	1,1	330	1 meq/g	-	Không
Spherisorb	Cation	80	0,5	220	6,0	-	Không
Ultremex	Cation	80	0,8	200	0,4 meq/g	2,88	Không

Về việc lựa chọn dây alkyl dài hoặc ngắn: có một nguyên tắc tổng quát là các hợp *chất tan có tính phân cực* được tách tốt hơn nhờ vào pha tĩnh có dây alkyl ngắn và *chất tan có tính kém phân cực* được tách tốt hơn nhờ vào pha tĩnh có dây alkyl dài.

Pha tĩnh nitril thường để tách các porphyrin. Các pha tĩnh aminoalkyl thường được sử dụng để tách các loại đường và peptid, tuy nhiên không nên sử dụng pha này để tách các hợp chất carbonyl vì các hợp chất này sẽ tạo thành base Schiff với pha tĩnh.

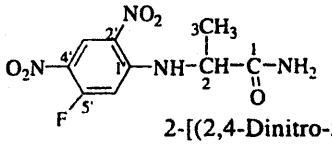


Aminopropyl Hợp chất carbonyl Base Schiff

2.2.3. Pha tĩnh thủ tính

Hoạt tính sinh học của các hợp chất thủ tính tùy thuộc vào hóa lập thể, nhiều cặp đối phân cho thấy chúng có hoạt tính trái ngược nhau, thí dụ đồng phân D-penicillamin có hoạt tính chữa bệnh trong khi đối phân L-của nó lại độc, vì vậy cần phải tách riêng chúng ra.

Cho đến giữa thập niên 1980, các pha tĩnh HPLC vẫn không thể tách được hỗn hợp gồm hai đối phân, bởi vì hai đối phân có tính chất vật lý và hoá học giống hệt nhau. Muốn tách hai đối phân, phải sử dụng thêm một cột phụ, đặt ở vị trí trước cột phân tích chính; cột phụ có chứa một tác chất có tính thủ tính (asymmetrical reagent). Khi hỗn hợp tiêu triển đi ngang qua cột phụ này thì chúng sẽ tác dụng với tác chất thủ tính để biến thành hai xuyên lập thể phân (diastereoisomer). Biết rằng hai xuyên lập thể phân có tính chất vật lý và hoá học khác nhau, vì thế dễ dàng tách riêng được bằng một cột pha thường hoặc pha đảo.



Tác chất Marfey

2-[(2,4-Dinitro-5-fluorophenyl)amino]propanamid

Trong HPLC, tác chất Marfey được sử dụng để tạo hỗn hợp xuyên lập thể phân với các hợp chất amin hoặc acid amin thủ tính. Tuy vậy, hiệu quả của loại kỹ thuật này dựa vào độ tinh khiết của hai sản phẩm xuyên lập thể phân tạo thành sau phản ứng. Trong thực nghiệm, hai đối phân tác dụng với tác chất Marfey với vận tốc khác nhau, đưa đến hệ quả là tỉ lệ phần trăm của sản phẩm tạo thành không đúng với tỉ lệ phần trăm của hai chất đối phân lúc ban đầu, nên kết quả không hoàn hảo. Chính vì nhược điểm đó mà các nhà khoa học đã nghiên cứu và đã đề xuất loại pha tĩnh thủ tính (chiral stationary phase).

Nguyên tắc hoạt động của pha tĩnh thủ tính: hai đối phân sẽ biến thành (với tính chất tạm thời, trong một khoảng thời gian ngắn ngủi, thoáng qua) hai xuyên lập thể phân đối với pha tĩnh, tạo nên phức chất kém bền. Phức chất nào kém bền sẽ bị giải ly ra khỏi cột nhanh hơn so với phức chất kia.

• ***Pha tĩnh Pirkle***

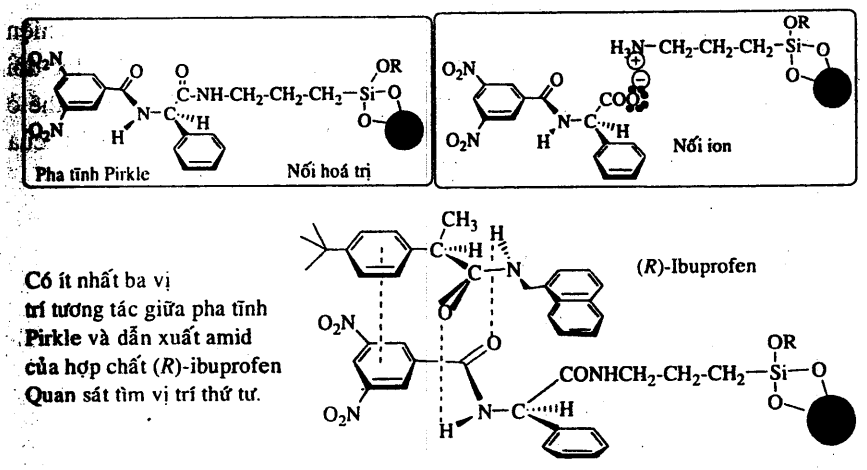
Tác giả Pirkle đã chế tạo pha tĩnh bằng cách cho một dẫn xuất amino acid có tính thủ tính là (*R*)-*N*-(3,5-dinitrobenzoyl)phenylglycin gắn vào hạt aminopropylsilica có kích thước 5 μm ngang qua một nối hóa trị hoặc bằng lực hút tĩnh điện giữa hai ion ngược dấu (Hình 6).

Để pha tĩnh Pirkle nhận diện được một hợp chất thủ tính, chất đó phải *có ít nhất* ba vị trí tương tác với pha tĩnh, trong đó phải có một vị trí phụ thuộc vào hóa lập thể. Ở các vị trí, sự tương tác có thể xảy ra nhờ vào các yếu tố sau: sự cho và nhận điện tử π giữa những mảnh nhân thơm (π-donor, π-acceptor aromatic fragments); sự tạo nối hydrogen liên phân tử và sự hút lưỡng cực.

Khi có ba điểm tương tác xảy ra, sẽ tạo nên một *phức xuyên lập thể phân* giữa pha tĩnh và chất thủ tính. Phức chất này được thành lập một cách thoáng qua, tạm thời và thuận nghịch. Mỗi đối phân sẽ tạo một phức với pha tĩnh với mức năng lượng khác nhau. Đối phân nào tạo phức bền hơn với pha tĩnh sẽ bị pha tĩnh giữ lại trong cột mạnh hơn, vì thế sẽ ra khỏi cột chậm so với đối phân kia.

Pha tĩnh Pirkle có nhiều vị trí có thể gây nên những loại tương tác như trình bày trên, nên pha tĩnh này được sử dụng để tách nhiều loại cặp đối phân như: alcol, hợp chất thơm có mang nhóm diol, diacylglycerol, những thuốc chữa bệnh có cấu trúc là các hợp chất dị hoàn....

Thí dụ pha tĩnh đã giữ mạnh đối phân (*R*)-ibuprofen như minh họa trong hình 6.



Hình 6: Sự tương tác giữa pha tĩnh thủ tính Pirkle với dẫn xuất amid của (*R*)-ibuprofen

• ***Pha tạo nối cyclodextrin***

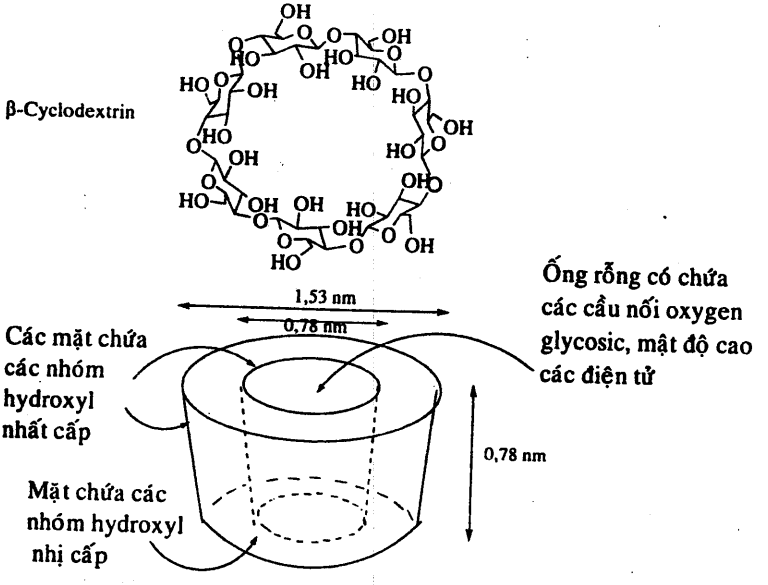
Cyclodextrin là carbohydrat có vòng, có tính thủ tính được cấu tạo bởi sáu, bảy hoặc tám đơn vị glucopyranose và được gọi tên lần lượt là: α-, β- và γ-cyclodextrin. Chỉ có β-cyclodextrin là được chọn làm pha tĩnh thủ tính trong sắc ký.

Một đơn chất β-cyclodextrin có cấu trúc như một hình ống trụ rỗng bị cắt cụt ở hai đầu. Đường kính bên ngoài của ống: 1,53 nm (x); đường kính bên trong của ống 0,78 nm (y); chiều cao của ống: 0,78 nm (z). Kích thước của α-cyclodextrin với x = 1,37 nm; y= 0,57 và z = 0,78 nm. Kích thước của γ-cyclodextrin với x = 1,89 nm; y= 0,95 và z = 0,78 nm.

Mặt trên và mặt dưới của cyclodextrin là một số nhóm hydroxyl nhị cấp. Mặt bên ngoài ống được bao bọc bởi những nhóm hydroxyl. Mặt bên trong của ống này được cấu tạo chủ yếu là các nhóm –OH và các nối 1,4-glycosic và mặt này có tính thủ tính với khoảng chừng 30 tâm thủ tính.

Khi cyclodextrin được sử dụng để làm pha tĩnh thủ tính, cơ chế lưu giữ chất chủ yếu là sự tạo phức chất. Cần phải thực nghiệm trong điều kiện pha đảo và chất tan cần có một nhóm thế là nhân thơm, để bảo đảm có sự tương

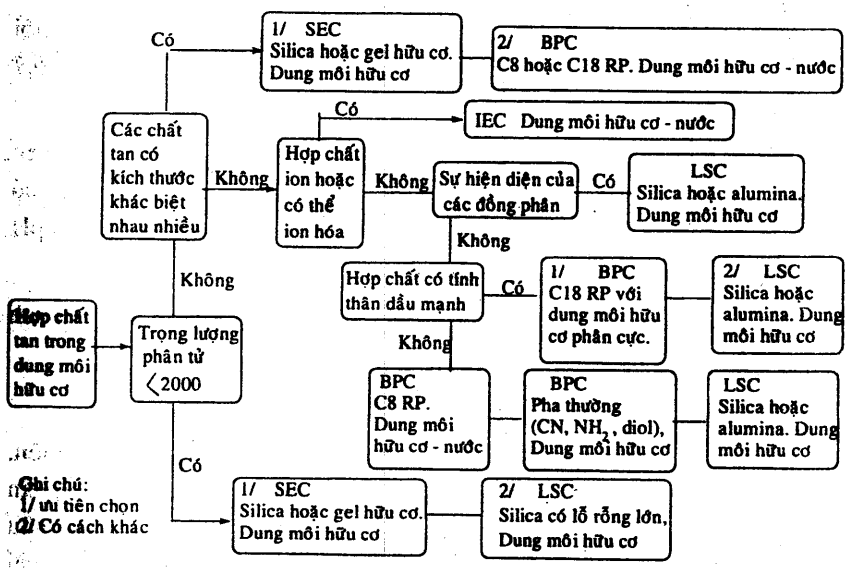
tác hoá lập thể giữa chất tan với oxygen glycosic, nếu không, chất tan sẽ hiện diện ở những vị trí lộn xộn bên trong ống và hệ thống mất tính chọn lọc đối phân. Ngoài ra, có thể có trường hợp chất tan phải có nhóm chức để có thể ở vào vị trí tạo nối hydrogen với các nhóm hydroxyl ở mặt trên của cyclodextrin.



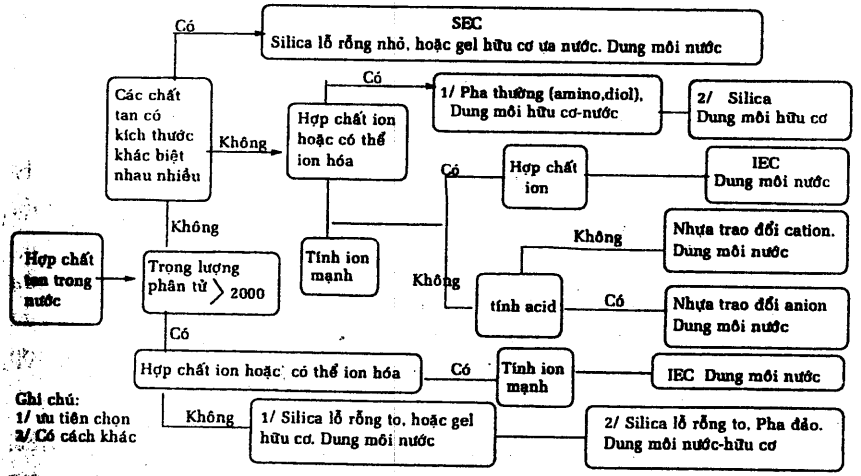
Hình 7: Mô hình tổng quát biểu diễn không gian ba chiều của β-cyclodextrin

2.2.4. Các loại pha tĩnh khác

HPLC có tất cả các loại pha tĩnh giống như trong sắc ký cột cổ điển. Có pha tĩnh trao đổi ion với các nhóm chức hoạt động cũng như cho sắc ký gel (Size exclusion chromatography, SEC). Pha tĩnh tạo nên bởi divinylbenzen được tạo mạng ngang bởi styren cho thấy ưu điểm vượt trội. Các hạt gel có kích thước với đường kính khoảng 50-10^6Å, và có khả năng tách chất có trọng lượng phân tử trong khoảng từ 10^2 đến $5x10^8$ Dalton.



Hình 8: Sơ đồ hướng dẫn việc lựa chọn loại cột HPLC khi muốn phân tích các hợp chất tan trong dung môi hữu cơ. Các chữ viết tắt: SEC: sắc ký gel. BPC: pha tĩnh tạo nối. IEC: pha tĩnh trao đổi ion. LSC: sắc ký rắn-lỏng.



Hình 9: Sơ đồ hướng dẫn lựa chọn loại cột HPLC để phân tích hợp chất tan trong nước

Loại gel này trương nở tối thiểu và chịu được hầu hết các loại dung môi hữu cơ ngoại trừ aceton, metanol. Hạt gel chịu được áp lực 3.000 psi (20,7 MPa).

Gần đây, có loại hạt với phần lõi nền làm bằng thủy tinh hoặc silica. Các hạt gel có đường kính khoảng 40-2500Å, và có khả năng tách chất có trọng lượng phân tử khoảng từ 10^2 đến $5x10^7$ Dalton. Loại gel này bền ở pH < 10, có thể sử dụng với các loại dung môi nước hoặc hữu cơ.

Hình 8 và 9 hướng dẫn việc lựa chọn loại cột HPLC khi muốn phân tích các hợp chất tan trong dung môi hữu cơ hoặc tan trong nước.

2.2.5. Sắc ký điều chế (preparative liquid chromatography)

Với các loại cột HPLC trình bày trên là loại cột phân tích, tuy nhiên, khi cần thiết cũng có thể sử dụng để cô lập một lượng mẫu chất đủ để phân tích NMR. Thực hiện bằng cách mỗi lần chích vào máy một lượng mẫu < 5 mg, dùng cột loại phân tích, đường kính bên trong # 4,6 mm; lặp lại vài ba lần sẽ thu được đủ lượng mẫu.

Ngoài ra cũng có loại cột điều chế: cột dài 300 mm, đường kính bên trong 50 mm, có thể tách đến 1 g mẫu.

3. CÁC LOẠI ĐẦU DÒ TRONG HPLC

(Đọc thêm phần phụ lục, về phổ điện từ)

Hoạt động của đầu dò là để theo dõi dòng chảy của dung môi giải ly cột để biết khi nào thì các hợp chất đi ra khỏi cột. Mỗi loại đầu dò có một nguyên tắc hoạt động khác nhau, nhưng đều phải đạt đến mục đích cuối cùng bằng một tín hiệu điện tử và tín hiệu này phải tỉ lệ với một số tính chất của chất phân tích, thí dụ mức hấp thu UV, chỉ số khúc xạ... Mức độ đáp ứng của đầu dò phải tỉ lệ với số lượng của mỗi chất phân tích hiện diện trong hỗn hợp mẫu phân tích.

Sự lựa chọn loại đầu dò tùy vào việc nhà phân tích muốn làm việc, nghiên cứu trên những loại hợp chất nào và các hợp chất đó có các đặc trưng hoá học nào. Từ tính chất các hợp chất muốn phân tích, chọn loại pha tĩnh của cột sắc ký, loại dung môi giải ly và loại đầu dò tương thích.

Một đầu dò HPLC lý tưởng đạt một số tiêu chuẩn như sau:

- Độ bền cao. Không làm hư hại mẫu phân tích

- Có độ nhạy cao và cho kết quả có tính lặp lại (reproducible)

- Cho đáp ứng tương đồng đối với những chất phân tích có cấu trúc hoá học tương đồng

- Không thay đổi khi có sự thay đổi nhiệt độ hoặc áp suất.

- Có thời gian đáp ứng ngắn, độc lập với vận tốc của dòng chảy của dung môi giải ly.

- Dễ sử dụng.

Trong thực nghiệm, không có một loại đầu dò nào thoả mản hết các yêu cầu trên. Chỉ có đầu dò khối phổ và đầu dò điện hoá là tương đối đáp ứng được các yêu cầu trên. Các nghiên cứu vẫn còn đang tiếp tục để tìm ra được loại đầu dò mới.

Các loại đầu dò HPLC có thể sắp xếp thành một số loại như sau.

* Đầu dò theo dõi *một tính chất hoá học đặc trưng* của các chất phân tích mà dung môi giải ly không có tính chất này, nhờ vậy có thể phát hiện sự hiện diện của chất tan khi nó hiện diện ở trong dòng chảy của dung môi giải ly. Các tính chất đó là: sự hấp thu UV (ultraviolet absorbance), hiện tượng hùynh quang (fluorescence).

* Đầu dò theo dõi sự *hiện diện một khối vật chất* trong dung môi giải ly, khối vật chất đó chính là hợp chất phân tích: chỉ số khúc xạ (refractive index), hằng số điện môi (dielectric constant).

Thí dụ: do sự hiện diện của hợp chất phân tích trong dung môi mà dòng dung môi tại vị trí lúc đầu dò phát hiện sẽ có giá trị chỉ số khúc xạ khác với giá trị chỉ số khúc xạ của dung môi giải ly lúc không có mẫu chất.

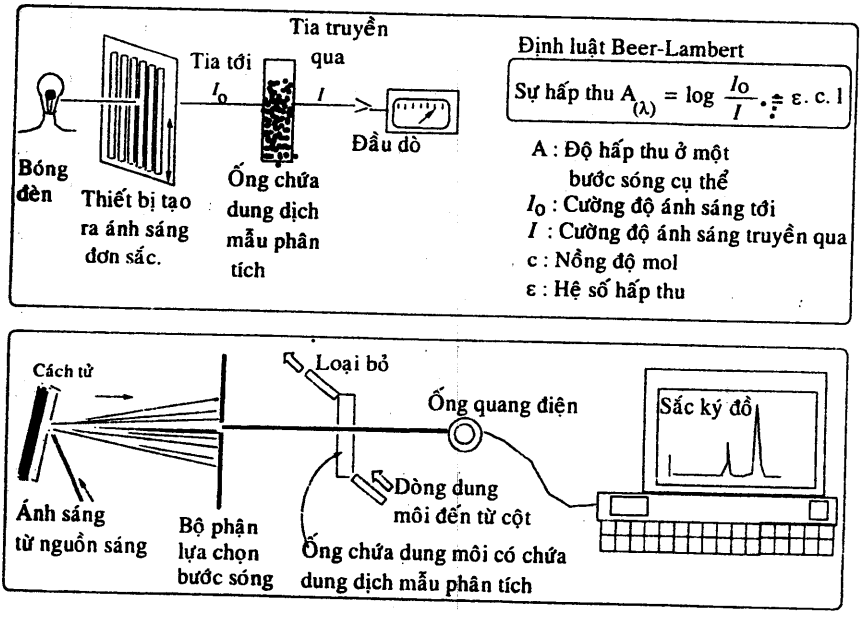
* Đầu dò kết hợp: tại thời điểm phát hiện, một lượng dung môi có chứa mẫu được loại bỏ bớt, tiếp theo, chất phân tích được phát hiện bằng phương pháp ion hóa ngọn lửa (FID) hoặc bằng khối phổ (Masse spectroscopy).

✳ Thực hiện phản ứng hoá học để điều chế chất dẫn xuất của hợp chất phân tích. Có hai cách: điều chế trước khi mẫu phân tích đi vào cột (pre-column derivatisation) hoặc điều chế sau khi mẫu phân tích ra khỏi cột (post-column derivatisation).

Bảng 4 trình bày một số tính chất đặc trưng của một số loại đầu dò.

3.1. Đầu dò đo hấp thu tia tử ngoại (Ultraviolet detector)

Lúc khởi đầu, pha động di chuyển ra khỏi cột, sắc ký đồ vạch một đường thẳng còn được gọi là đường nền với mức hấp thu bằng zero. Khi dòng dung môi có mang chất phân tích, chất phân tích sẽ hấp thu UV khiến cho sự hấp thu của dòng dung môi thay đổi, ống quang điện làm xuất hiện một pic trên sắc ký đồ.



Hình 10: ***Hình trên:*** **Nguyên tắc đo quang phổ UV.**

Hình dưới: **Mô tả nguyên tắc đầu dò UV chỉnh đổi được bước sóng, của HPLC**

Hệ thống đầu dò gồm một nguồn sáng, một thiết bị lựa chọn bước sóng, một ống quang điện (phototube), một ống chứa dung dịch mẫu phân tích (sau khi ra khỏi cột sắc ký, dung môi giải ly có chứa mẫu chất sẽ đi ngang qua ống này, sau đó, được thải bỏ hoặc thu hứng mẫu trong trường hợp sắc ký điều chế).

Có loại đầu dò chỉ hoạt động ở một bước sóng cố định, cũng có loại có thể điều chỉnh để đo ở những bước sóng khác nhau.

Loại bước sóng thường sử dụng là 254 nm. Bước sóng này dễ dàng có được bằng cách sử dụng nguồn sáng là đèn thủy ngân, và lọc lấy tia 254 nm bằng một bộ lọc dãy hẹp. Có thể sử dụng các bộ lọc khác để có bước sóng 220, 313, 334, 365, 436 và 546 nm. Việc lựa chọn để đầu dò hoạt động ở bước sóng nào tùy vào sự phân tích loại hợp chất hữu cơ có mức hấp thu mạnh, vượt trội so với những hợp chất khác ở bước sóng đó.

Loại đầu dò này được sử dụng nhiều nhất trong máy HPLC, vì nó không nhạy với nhiệt độ, có sự đáp ứng tuyến tính giữa sự hấp thu UV với lượng mẫu chất.

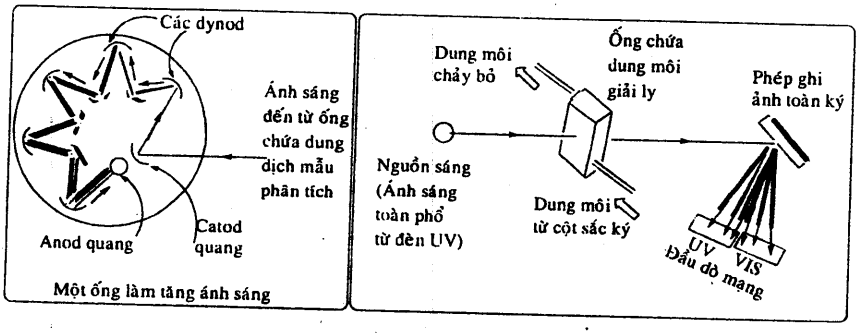
Nhược điểm: loại đầu dò này khá kén chọn loại hợp chất phân tích vì một số loại hợp chất hấp thu UV rất kém, thí dụ: barbiturat, các loại thuốc trừ sâu. Hơn nữa, định luật Beer-Lambert là định luật có giới hạn: đường biểu diễn mức hấp thu A theo nồng độ của chất thường chỉ có tính tuyến tính trong những khoảng hẹp về nồng độ (low concentration ranges).

3.2. Đầu dò mạng diod quang (photodiode array spectrophotometer)

Đầu dò mạng diod quang cho phép quét (scanning) một cách liên tục quang phổ hấp thu của một chất phân tích đang hiện diện trong dòng chảy của dung môi giải ly, nên không cần phải làm ngưng dòng chảy.

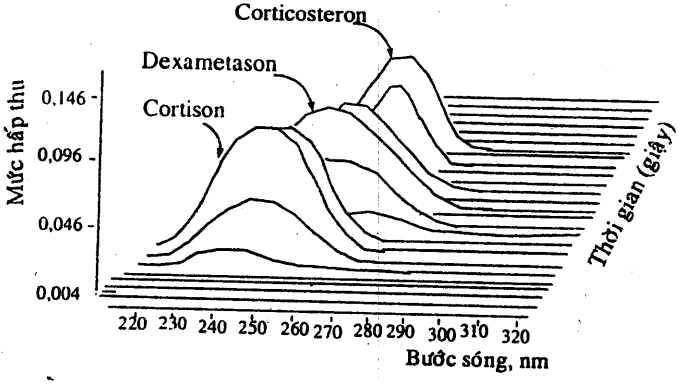
Máy quang phổ mạng diod quang có cách bố trí sắp đặt các bộ phận của hệ thống ở vị trí ngược lại với đầu dò đo hấp thu tia tử ngoại, trong đó tất cả ánh sáng đến từ nguồn sáng đều được tập trung chiếu vào ống chứa dung dịch mẫu phân tích (không phải giống như máy đo UV, các ánh sáng đi ngang qua một bộ lọc dãy hẹp để chỉ ló ra một tia với bước sóng xác định). Toàn phổ ánh sáng, sau khi đi xuyên ngang qua ống chứa mẫu, được một

máy nhiễu xạ ánh sáng toàn phổ (a holographic diffraction grating) tán xạ thành những bước sóng đơn, các bước sóng đơn này được tập trung vào một mạng diod quang. Mạng diod quang là một dãy đầu dò, lên đến 1056 cái, gắn trên những chíp điện tử (chip); mỗi diod nhận một bước sóng khác nhau với độ phân giải của phổ khoảng 1,2 nm.



Hình 11: Mô tả nguyên tắc đầu dò mạng diod quang

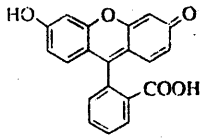
Khi tia sáng truyền đến diod quang, những dòng điện miliamper được phát sinh. Tín hiệu điện tử từ mỗi đầu dò diod quang được xử lý để cho dữ liệu hấp thu, dữ liệu này được trình bày thành một phổ, và như thế nhiều phổ sẽ được trình bày, mỗi phổ cách nhau ít nhất là 0,01 giây. Dữ liệu hấp thu có thể được biểu diễn thành một hàm của bước sóng theo thời gian, như trình bày trong hình 12.



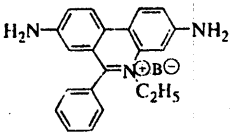
Hình 12: Sắc ký đồ HPLC với đầu dò mạng diod quang khảo sát một hỗn hợp ba hợp chất.

3.3. Đầu dò phát huỳnh quang (fluorescence detector)

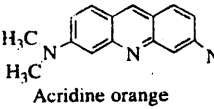
Hợp chất phát huỳnh quang là hợp chất phát sáng khi được ánh sáng chiếu vào. Một số ít hợp chất có tính chất phát huỳnh quang, thí dụ hấp thu bức xạ của một bước sóng và hệ quả là phát ra bức xạ có bước sóng dài hơn có tính phát huỳnh quang. Các hợp chất phát huỳnh quang kiểu mẫu thường có cấu trúc hoá học là hệ thống vòng tiếp cách nhiều, thí dụ các hợp chất sau.



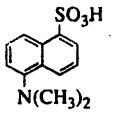
Fluorescein



Bromur ethidium



Acridine orange

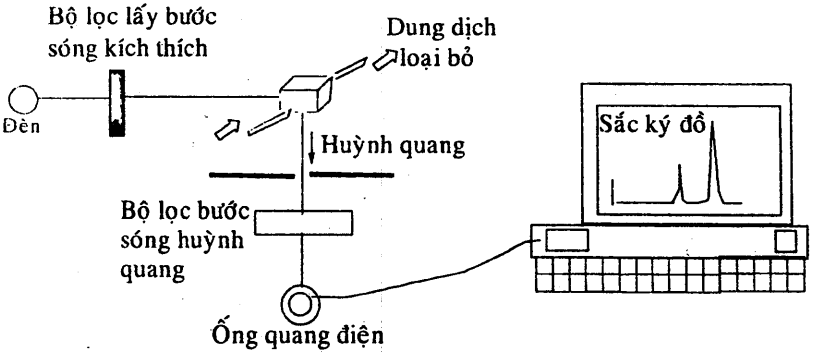


Clorur dansyl

Nhiều loại hợp chất không phát huỳnh quang nhưng khi cho tác dụng với các tác chất mang nhóm fluoro phát huỳnh quang biến thành chất dẫn xuất có tính phát huỳnh quang. Thí dụ các amino acid không phát huỳnh quang khi tác dụng với *orto*-pthaldehyd hoặc ninhydrin sẽ biến thành các chất dẫn xuất có tính phát huỳnh quang.

Hợp chất clorur dansyl (acid 5-dimetylamino-1-naptylsulfonic) là tác chất hữu hiệu để tạo thành chất dẫn xuất phát huỳnh quang với các loại hợp chất như amin, amino acid, phenol.

Các tính chất căn bản của hợp chất phát huỳnh quang được áp dụng để làm dầu dò trong HPLC.

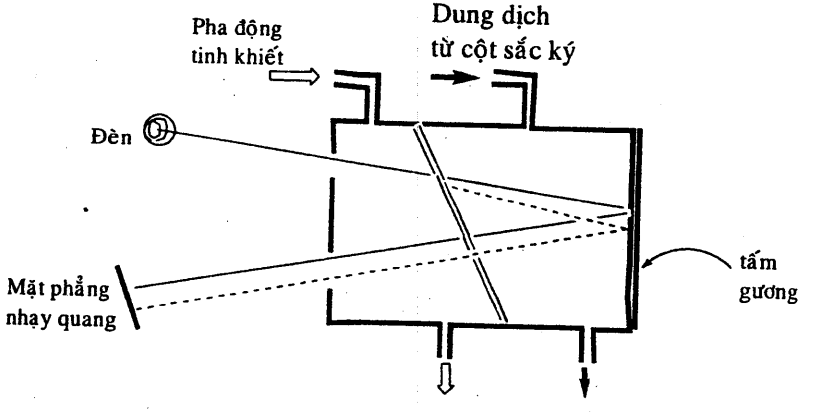


Hình 13: Mô tả nguyên tắc đầu dò huỳnh quang của HPLC

So với đầu dò hấp thu tử ngoại, đầu dò huỳnh quang nhạy hơn, có thể phát hiện hợp chất hiện diện ở hàm lượng 1 ng/ml, nhưng có tính chọn lọc cao hơn là chỉ cho mũi tín hiệu trên sắc ký đồ khi mẫu phân tích là hợp chất huỳnh quang, vì thế loại đầu dò này không thông dụng cho máy HPLC.

3.4. Đầu dò chỉ số khúc xạ (Refractive index detector, RI detector)

Chỉ số khúc xạ (n) của một chất lỏng hoặc một dung dịch chất lỏng được định nghĩa là tỉ số giữa vận tốc ánh sáng di chuyển trong chân không so với vận tốc ánh sáng di chuyển qua môi trường đó. Chỉ số khúc xạ không có đơn vị. Do vận tốc của ánh sáng trong bất kỳ môi trường vật chất nào cũng nhỏ hơn vận tốc ánh sáng trong chân không, nên chỉ số khúc xạ của bất kỳ dung dịch nào cũng có giá trị lớn hơn một (> 1).



Hình 14: Mô tả nguyên tắc đầu dò chỉ số khúc xạ của HPLC

Một tia sáng đi ngang qua hai ống, được cho tập trung về một mặt phẳng nhạy sáng (photosensitive surface). Khi cả hai ngăn chứa đều có chứa pha động tinh khiết, vị trí của tia tới trên bề mặt cảm quang được xem như là điểm đối chứng (reference point) và được bút ghi vẽ giá trị zero. Khi pha động chứa hợp chất giải ly vừa ra khỏi cột, chỉ số khúc xạ của một ngăn chứa sẽ thay đổi, tia sáng bị lệch, và tia khúc xạ của nó sẽ chạm đến mặt phẳng nhạy sáng ở một vị trí khác, làm cho bút ghi vẽ một tín hiệu.

** Ưu điểm*

- Loại đầu dò này thông dụng, vì tất cả hợp chất đều có chỉ số khúc xạ đặc trưng riêng (đó là tính chất vật lý của hợp chất), vì vậy, sẽ hiếm khi gặp trường hợp một dung dịch chứa hỗn hợp hợp chất mà không ghi được tín hiệu nào, bởi vì hợp chất có chỉ số khúc xạ bằng với chỉ số khúc xạ của dung môi pha động.

- Không làm hư hại mẫu phân tích.

** Nhược điểm*

- Độ nhạy cảm trung bình, khoảng 1 ppm mẫu trong dung môi. Nếu so với đầu dò hấp thu tử ngoại có độ nhạy là 1 thì đầu dò chỉ số khúc xạ kém thua, chỉ là 1/1000.

- Không phân tích được hợp chất ở dạng vết.

- Nhạy cảm với sự thay đổi nhỏ về nhiệt độ

- Rất khó làm việc khi giải ly cột sắc ký với pha động mà độ phân cực được cho tăng dần tuyến tính vì khó hiệu chỉnh chỉ số khúc xạ giữa mẫu phân tích so với chỉ số khúc xạ của dòng dung môi tinh khiết sử dụng làm mẫu đối chứng đang chảy (đầu dò nhạy cảm khi pha động có sự thay đổi thành phần).

3.5. Đầu dò đo độ dẫn điện (Conductivity detector)

Hầu hết các loại đầu dò là đầu dò dẫn điện. Loại đầu dò này đặc biệt hữu dụng khi thực hiện với loại sắc ký trao đổi ion, với hợp chất được giải ly ra khỏi cột là loại hợp chất ion. Vì thế, máy ghi nhận một cách liên tục độ dẫn điện của dòng chảy sẽ rất hữu ích để phát hiện được những hợp chất vừa được giải ly ra khỏi cột sắc ký.

Kiến thức căn bản trong khoa học dung dịch là sự hiện diện của các ion trong bất kỳ một dung dịch nào cũng làm cho dung dịch đó có tính dẫn điện yếu và có khả năng dẫn một dòng điện. Sự vắng mặt của các ion làm cho dung dịch đó sẽ không dẫn điện. Như vậy, dung dịch của các hợp chất ion và acid nhất là loại acid mạnh sẽ có tính dẫn điện. Nghĩa là nếu một cặp hai bề mặt dẫn điện được ngâm vào dung dịch và được nối với một nguồn điện, sẽ thấy dòng điện chảy giữa hai bề mặt đó.

Trong nhiều năm dài, ý niệm về đầu dò độ dẫn điện không được sử dụng, kể cả khi có kỹ thuật sắc ký trao đổi ion với pha động là các loại dung dịch với nồng độ ion cao, chỉ đến khi xuất hiện khái niệm về bộ triệt ion (ion suppressor). Bộ triệt là một cột ngắn được đặt vào trong dòng chảy, ở vị trí liền ngay sau cột phân tích sắc ký.

Nguyên tắc hoạt động của bộ triệt, giống như một ống khử ion được đặt ở đầu ra của vòi nước máy trong các phòng thí nghiệm. Ống khử nước máy này sử dụng một loại nhựa trao đổi ion với đối-ion là H^+ và OH^-. Các ion hiện diện trong nước máy như Ca^{2+}, CO_3^{2-}... sẽ trao đổi ion với ion H^+ và OH^- và kế đó các ion này phản ứng với nhau, tạo thành nước. Hệ quả là các ion Ca^{2+}, CO_3^{2-}... đã được loại ra khỏi nước.

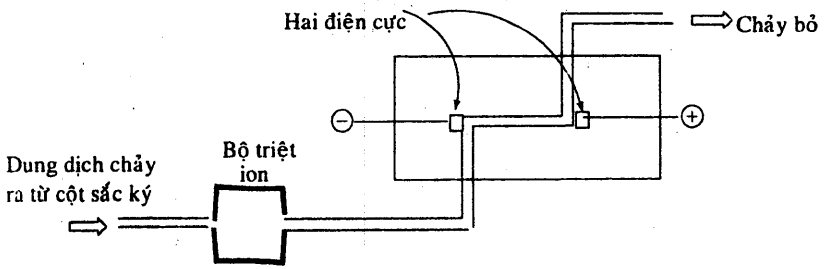
Với máy HPLC, bộ triệt là một cột được nhồi bởi một loại nhựa trao đổi ion, nhằm loại bỏ các ion ra khỏi dòng chảy pha động. Tuy nhiên, bộ triệt của HPLC phải có tính chọn lọc, chỉ loại bỏ một số loại ion của pha động.

Máy đo độ dẫn điện có bán sẵn là một buồng chứa mẫu có dung tích khoảng 1 µl, để theo dõi các ion vô cơ như Na^+, NH_4^+, K^+, cũng như các anion, các halogenur X^-, NO_3^-, SO_4^{2-}. Máy đo độ dẫn là hai điện cực, dán lên buồng chứa dung dịch mẫu, và dán lên một cầu Wheatstone có dòng điện một chiều, nhờ thế một thay đổi nhỏ về độ dẫn điện của dung dịch giải ly sẽ được phát hiện.

Trong phần lớn các loại ion hữu cơ và vô cơ trong môi trường nước, độ dẫn điện tỉ lệ thuận với nồng độ của ion hiện diện trong dung dịch. Tuy nhiên, các loại hợp chất ion thường được tách khi sử dụng các dung dịch giải ly chủ yếu là dung dịch nước có chứa các chất điện ly (electrolytes). Lực ion có giá trị cao của dung dịch này sẽ làm giảm độ nhạy của đầu dò dẫn điện, vì thế đầu dò dễ bị ảnh hưởng khi dòng chảy (chứa mẫu) có sự thay đổi về thành phần hóa học. Với bộ triệt, rất khó áp dụng kỹ thuật giải ly tăng dần độ phân cực tuyến tính. Có thể khắc phục bằng cách sử dụng bộ triệt ion để loại bỏ các chất điện ly nền (background electrolyte).

Đầu dò cũng bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ.

Một sơ đồ đầu dò độ dẫn điện, ống dẫn dung dịch giải ly đi vào và đi ra khỏi buồng chứa mẫu được cho hoạt động như hai điện cực.



Hình 15: Mô tả nguyên tắc đầu dò độ dẫn điện của HPLC

3.6. Đầu dò amper kế (Amperometric detector)

Đầu dò điện hóa (Electrochemical detector) được thông dụng vì nó nhạy, có thể áp dụng để phân tích nhiều loại hợp chất có điện tử linh động (electroactive).

Nhiều loại nhóm định chức hóa học (của phân tử hữu cơ) trong dung dịch, bị oxid hoá (be oxidised) hoặc bị khử (reduced) sẽ cung cấp một điện thế.

Trong máy HPLC, một điện thế cố định được áp vào điện cực của đầu dò với khả năng đủ để oxid hoá hoặc khử một loại hợp chất nào đó đang cần khảo sát, và dòng điện sẽ được liên tục ghi nhận. Dòng điện được tạo ra ở trong khoảng nA và sự nhạy, chính xác tốt hơn gấp 10^4 lần so với đầu dò hấp thu UV.

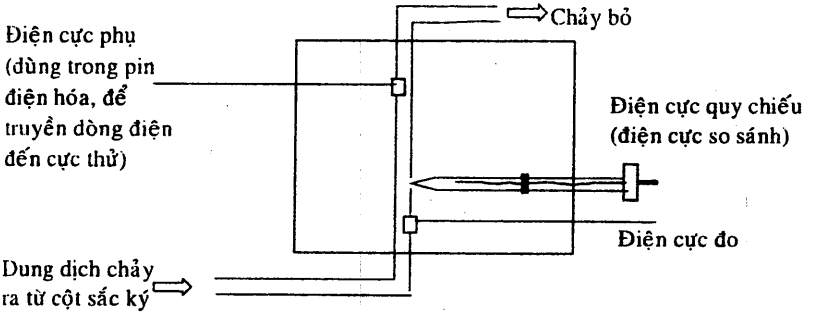
Có thể sử dụng loại đầu dò để khảo sát nhiều loại hợp chất như trình bày trong bảng 5.

Bảng 4: Tính chất đặc trưng của một số loại đầu dò.

Loại đầu dò	Giới hạn phát hiện lượng mẫu (g/ ml)	Mức tuyến tính	Nhạy cảm với tốc độ dòng chảy	Nhạy cảm với nhiệt độ	Hữu ích với dung môi pha động tăng độ phân cực gradient	Loại mẫu phân tích phù hợp	Tỉ lệ sử dụng với HPLC (%)
UV	5×10^{-10}	10^4–10^5	Không	Thấp	Có	Hợp chất thơm, dị hoàn. Hợp chất có nhiều nối đôi liên hợp	78
Photo-diod	$> 2 \times 10^{-10}$	10^4–10^5	Không	Thấp	Có	Hợp chất thơm, dị hoàn	18
Huỳnh quang	$\# 10^{-12}$	10^3–10^4	Không	Thấp	Có	Vitamin, steroid	31
Hồng ngoại (IR)	10^{-6}	$\# 10^3$	Không	Thấp	Có	Hợp chất carbonyl, Hydrocarbon	< 5
Chỉ số khúc xạ	5×10^{-7}	10^3–10^4	Không	$\pm 10^{-4}$ °C	Không	Tất cả các loại hợp chất	37
Đo độ dẫn (điện)	10^{-8}	10^3–10^4	Có	± 1 °C	Không	Hợp chất ion	15
Điện hóa	10^{-12}	10^4–10^5	Có	± 1 °C	Không	Hợp chất có độ âm điện mạnh. Catecholamin	21
Khối phổ	10^{-10}	10^4	Không	Không	Có	Tất cả các loại hợp chất	5
Chuyển qua FID	5×10^{-7}	10^4–10^5	Không	Không	Có	Hydrocarbon có thể oxid hoá	< 5

Bảng 5: Các loại hợp chất có thể được phát hiện bằng đầu dò điện hoá.

Oxid hoá		Khử	
Hydrocarbon	**Phenol**	**Olefin**	**Eter**
Amin	Quinolin	Ester	Hợp chất diazo
Amid	Catecholamin	Ceton	Hợp chất nitro
		Aldehyd	



Hình 16: Mô tả nguyên tắc đầu dò amper kế của HPLC

Sự oxid hóa–khử điện hóa của hợp chất có trong dung dịch giải ly là nguyên tắc căn bản cho loại đầu dò amper kế điện hoá. Để phát hiện cần có ba điện cực: điện cực đo (làm việc), điện cực quy chiếu, và điện cực phụ. Cả ba điện cực được đặt vào dòng chảy hoặc cho áp sát vào vách ngăn của dòng chảy. Điện cực đo được làm bằng thủy tinh trong suốt (glassy carbon), platin, hoặc bằng vàng. Điện cực quy chiếu được làm bằng clorur bạc và điện cực phụ bằng thép không gỉ. Trong đa số trường hợp, *điện cực đo* được làm phân cực (polarized) để gây sự oxid hoá cho hỗn hợp các hợp chất được giải ly. Dòng điện oxid hóa được đo, biến đổi thành tín hiệu để được máy ghi lại.

Đầu dò này được áp dụng rộng rãi cho cả các loại hợp chất ion và hợp chất trung tính nếu chúng có thể bị oxid hoá (hoặc bị khử) ở một mức điện áp phân cực tương đối nhỏ.

Độ nhạy tốt hơn đầu dò UV, nhưng kém thua đầu dò huỳnh quang.

Nhược điểm: điện cực đo có thể bị tắt do bề mặt của điện cực bị bao phủ bởi các sản phẩm của phản ứng điện hóa; cần phải vệ sinh điện cực thường xuyên.

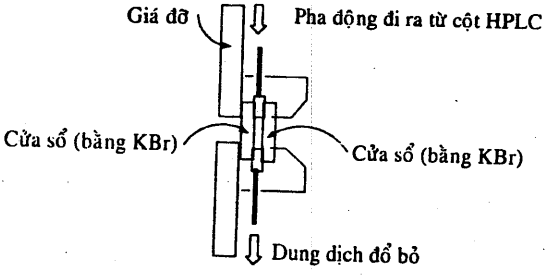
3.7. Đầu dò LC-IR

Các nhà nghiên cứu thử nghiệm các loại đầu dò khác nhau cho máy HPLC như: phổ cộng hưởng từ hạt nhân, Raman, phổ hấp thu và phóng thích nguyên tử...

Tuy rằng máy sắc ký khí có áp dụng loại đầu dò khối phổ và hồng ngoại: máy sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS) và sắc ký khí ghép hồng ngoại (GC-IR), nhưng mãi đến những năm gần đây, hai kỹ thuật này mới được áp dụng cho máy HPLC: sắc ký lỏng-khối phổ (LC-MS) và sắc ký lỏng – hồng ngoại (LC-IR).

Phổ hồng ngoại là một kỹ thuật phân tích quen thuộc giúp xác định cấu trúc hoá học các hợp chất, các hợp chất này có thể ở thể lỏng hoặc thể khí và có sẵn các giao diện để có thể đưa mẫu vào máy sắc ký khí (GC) hoặc sắc ký lỏng (LC). Đầu dò phải có độ nhạy đủ, để với một dòng chảy từ cột sắc ký GC hoặc HPLC, có chứa nanogram mẫu chất trong 1 ml dung môi pha động, chảy ngang qua, thì đầu dò cũng có thể ghi được một phổ IR.

Kỹ thuật hồng ngoại biến đổi Fourrier (FTIR) giúp đạt các tiêu chí vừa nêu ra nhưng vì đắt tiền nên chỉ mới được đưa vào sử dụng những năm gần đây.



Hình 17: Mô tả nguyên tắc ngăn chứa dung dịch mẫu đi ra từ cột sắc ký được ghi nhận bằng IR trong máy HPLC

Kích thước của ngăn chứa pha động (để ghi nhận phổ IR của dung dịch mẫu) có thể tích nhỏ hơn 20 µl; đoạn đường mà dòng chảy cần chảy ngang qua là 2-3 mm.

Nguyên liệu làm ngăn chứa: Nếu pha động là dung môi hữu cơ, cửa sổ để ghi phổ IR được làm bằng NaCl hoặc NaBr. Lưu ý: khi sử dụng loại cửa sổ này, pha động chứa mẫu không được có lẫn nước. Nếu pha động là dung môi hữu cơ và nước, cửa sổ phải được làm bằng polytetrafluoroetylen (PTFE) và polyetylen.

Nhờ kỹ thuật biến đổi Fourrier nhanh, có thể ghi toàn bộ phổ IR của từng thành phần của một hỗn hợp khi mỗi chất đó được giải ly ra khỏi cột sắc ký và đi ngang bộ phận đầu dò, tại đây hợp chất được ghi phổ IR lưu trữ lại để phân tích sau này.

3.8. Đầu dò LC-MS

Máy khối phổ không tương thích (incompatibility) với hệ thống HPLC với các khác biệt cơ bản giữa hai loại máy là:

- Máy khối phổ (MS) hoạt động trong điều kiện: áp suất thấp (chân không sâu, high vacuum), nhiệt độ cao, lượng mẫu phân tích rất nhỏ, chất khảo sát phải ở thể khí, vận tốc dòng chảy nhỏ (vài µl/ phút).

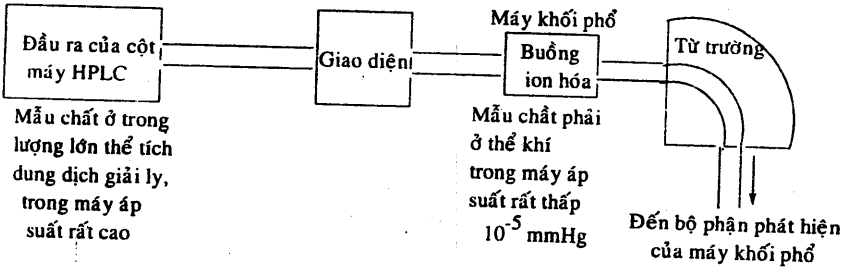
- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) hoạt động trong điều kiện: áp suất cao, nhiệt độ tương đối thấp, mẫu chất ở trong dòng chảy của pha động với lượng lớn thể tích, chất khảo sát ở thể lỏng, vận tốc dòng chảy lớn (vài ml/ phút).

Khi nối đầu ra của máy HPLC vào một máy khối phổ có nghĩa là mẫu chất đang ở trong dung dịch (trong dung môi giải ly) phải chịu một sự chuyển đổi với sự cách biệt rất lớn. Để khắc phục những khó khăn trên trong việc ghép hai loại máy với nhau, cần phải có một trung gian là giao diện.

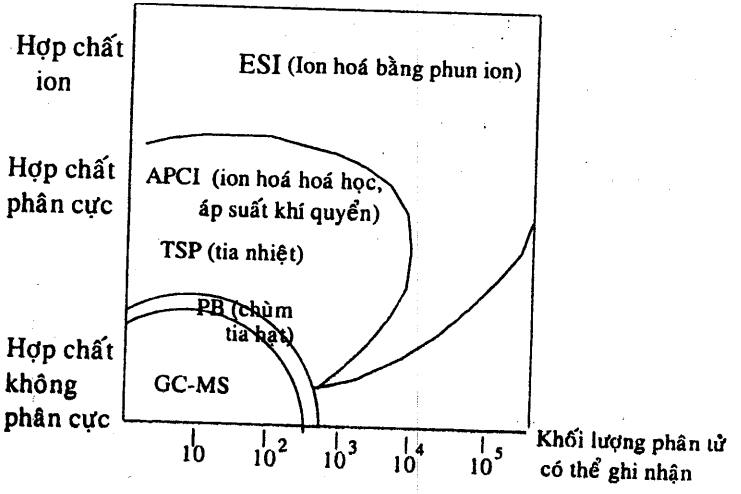
Có nhiều loại giao diện khác nhau dùng cho HPLC-MS như: tia nhiệt (thermospray, TSP), ion hóa hóa học ở áp suất khí quyển (Atmospheric pressure chemical ionization, APCI), chùm tia hạt (Particle beam, PB), phun ion (Electrospray, ES) ... Tùy thuộc vào khối lượng phân tử và đặc tính (phân

cực-không phân cực) của hợp chất khảo sát, sử dụng máy LC-MS với các kỹ thuật giao diện khác nhau.

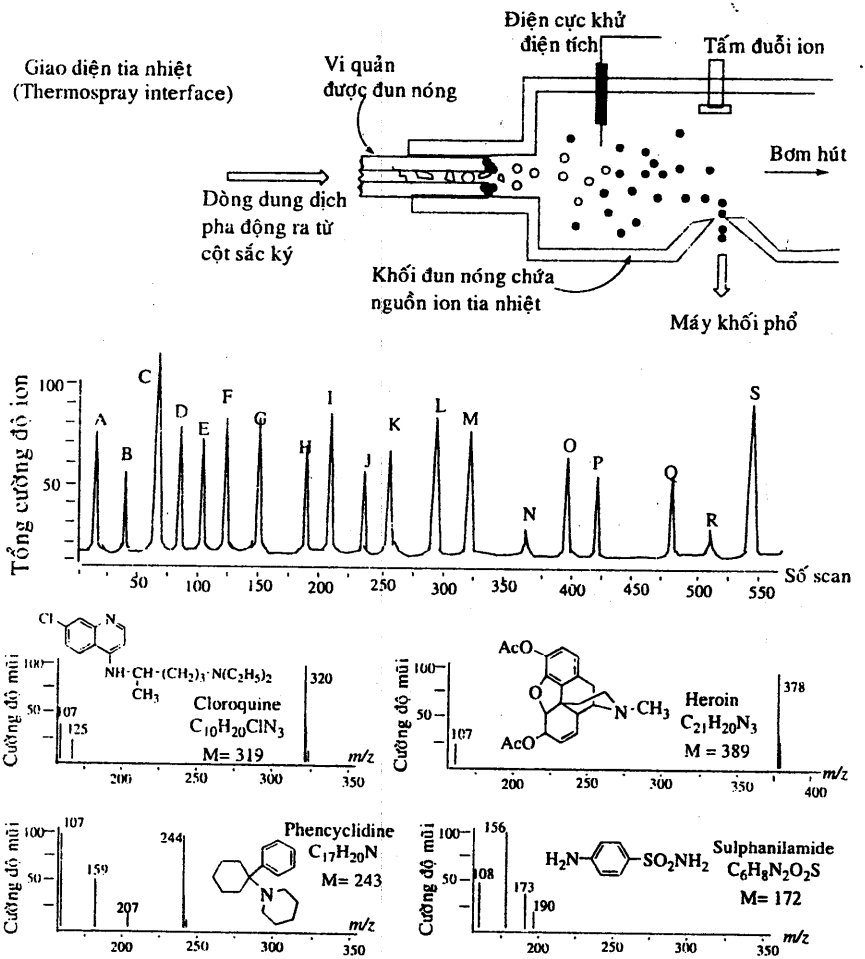
Hình 19 cho biết phạm vi thích hợp để áp dụng LC-MS trong việc khảo sát các hợp chất có khối lượng và tính chất khác nhau.



Hình 18: Sơ đồ tổng quát máy sắc ký lỏng ghép khối phổ (LC-MS)



Hình 19: Phạm vi để áp dụng LC-MS với các giao diện khác nhau, tùy thuộc vào khối lượng phân tử và tính chất phân cực của hợp chất cần khảo sát



Hình 20: HPLC-MS với hệ thống giao diện tia nhiệt để phân tích hỗn hợp các loại thuốc

- ***Hình trên*: Giao diện tia nhiệt (Thermospray interface)**
- ***Hình giữa*: Sắc ký đồ toàn phổ. A: cocaine; B: acetophenazine; C: chlordiazepoxide; D: chlorpromazine; E: chloroquine; F: heroin; G: hyosine; H: imipramine; I: ketazolam; J: LSD; K: meprobamate; L: norpseudoephedrine; M: noscapine; N: papaverine; O: paracetamol; P: paraquat; Q: phencyclidine; R: phenobarbitone; S: sulphanilamide.**
- ***Hình dưới*: Một số khối phổ: khối phổ của các mũi E, F, Q, S.**

3.8.1. Giao diện tia nhiệt (Thermospray interface)

Giao diện này cho phép đưa trực tiếp, liên tục dòng chảy của pha động vào bộ phận ion hóa của máy khối phổ. Dòng pha động được chuyển vào bên trong giao diện ngang qua một ống vi quản đun nóng, có đường kính khoảng 0,1 mm. Dung môi được làm bốc hơi và hình thành một tia khí có chứa những hạt sương mang điện tích. Khi những hạt sương tiếp tục di chuyển ngang qua khối nóng, chúng được tiếp tục làm bốc hơi, khiến cho các hạt sương có mang điện tích bị gia tăng gradient trường (field gradient). Và hệ quả là các ion được tách rời ra khỏi các hạt sương và tiếp theo, do chịu sự định hướng bởi tấm đuỗi ion, các ion này di chuyển về cái lỗ (orifice), dẫn vào máy phân tích khối phổ.

Sự ion hóa càng thêm hiệu quả nếu dung môi pha động của HPLC chứa thêm chất điện ly (electrolyte) có tính bay hơi, thí dụ như 0,1-1% acid acetic hoặc acetat ammonium.

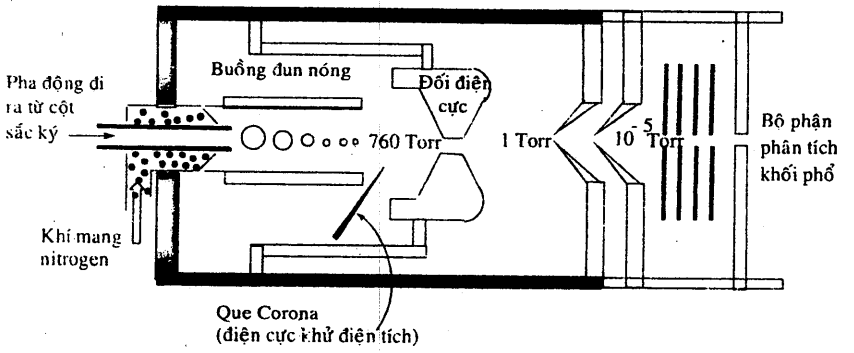
Hệ thống này có thể làm bốc hơi và ion hóa một cách ổn định một pha động có tính phân cực, ở vận tốc dòng chảy 2 ml/ phút.

Hình 20 mô tả nguyên tắc tổng quát về giao diện tia nhiệt và sắc ký đồ HPLC-MS sử dụng giao diện tia nhiệt.

3.8.2. Giao diện Ion hóa ở áp suất khí quyển (Atmospheric Pressure Ionization interface, APCI).

Giao diện này giúp chịu được dòng chảy của pha động lên đến 2 ml/ phút vì thế nó phù hợp để làm việc với nhiều loại hợp chất có tính bay hơi và không bay hơi.

Pha động lỏng sau khi ra khỏi cột sắc ký HPLC được cho đi ngang qua giao diện và tại đây nó được chuyển thành sol khí (aerosol) bởi một máy phun sương bằng khí nitrogen với vận tốc cao. Khí nitrogen này sẽ lôi cuốn mẫu chất vào buồng nung nóng. Trong buồng nung nóng, tại khoảng không gian ở giữa điện cực khử giải ion (discharge electrode) và đối điện cực (counter electrode), sự ion hóa xảy ra dưới dạng khử giải.



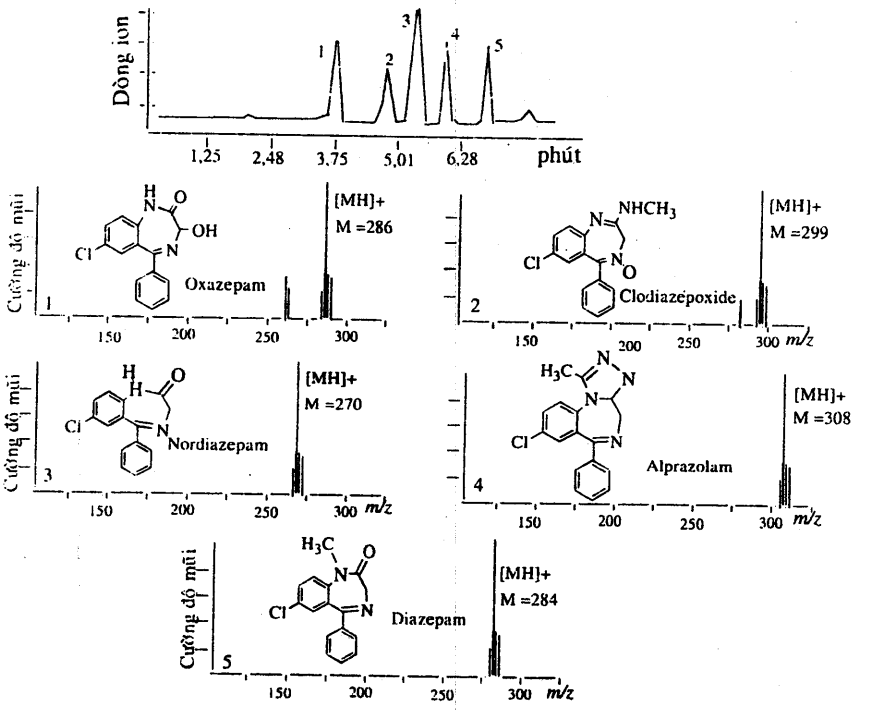
Hình 21: Giao diện Ion hóa ở áp suất khí quyển trong máy HPLC-MS

Trong buồng ion hoá, một loại khí phản ứng (reactant gas: metan, isobutan, ammoniac...) được cho biến thành loại ion nhất cấp, ion này sẽ hoạt động như một phương tiện để ion hóa. Ion này sẽ tác dụng với mẫu hợp chất (có khối lượng phân tử là M) để biến mẫu hợp chất thành ion $(MH)^+$ có giá trị *m/z* lớn hơn 1 đơn vị khối lượng so với *m/z* của ion phân tử, được gọi là ion tựa–phân tử (quasi-molecular ion).

Ion phân tích có thể ở dạng $(M+H)^+$ nếu phân tích ở chế độ ion dương hoặc ở dạng $(M- H)^-$ nếu phân tích ở chế độ ion âm (negative ion mode). Do ion tựa–phân tử có nội năng nhỏ hơn so với nội năng của ion phân tử $M^{+\cdot}$ tạo ra bằng cách bắn phá ion, cách tạo ion kiểu này gọi là sự ion hóa êm dịu (soft ionization), cho phép bảo toàn được ion phân tử.

Các ion tiếp tục đi vào vùng có áp suất trung gian 1 torr để đi vào các điện cực giống như những muỗng hớt bọt (skimmer electrode) và vào bộ phận phân tích khối phổ.

Hình 22 sắc ký đồ của một hỗn hợp gồm 5 hợp chất benzodiazepine phân tích bằng HPLC-MS. Trước tiên, máy HPLC tách hỗn hợp thành 5 mũi, nghĩa là 5 hợp chất, được đánh số từ 1 đến 5. Dòng dung dịch, sau khi đi ra khỏi máy HPLC, được cho vào máy khối phổ, máy phân tích rồi so sánh với các dữ liệu trong thư viện máy, cho biết tên, công thức khai triển, khối lượng phân tử của mỗi hợp chất có trong hỗn hợp.



Hình 22: Sự phối hợp sắc ký lỏng-khối phổ HPLC-APCI để phân tích một hỗn hợp gồm 5 hợp chất benzodiazepine. Vận tốc dòng chảy 1,2 ml/phút. Pha động acetonitril: metanol: nước (40:25:35)

3.8.3. Giao diện Phun ion (Electrospray interface, ESI)

Giao diện Phun ion là một cải biên của loại giao diện ion hóa ở áp suất khí quyển.

Trước khi vào bộ phận của máy khối phổ, pha động giải ly ra từ cột sắc ký được cho hòa tan vào một hệ mạng chất lỏng (liquid matrix): có thể là nước hoặc nước-hữu cơ. Thí dụ: pha động được cho hòa tan vào hỗn hợp đồng lượng metanol: dung dịch nước 1-5% acid acetic hoặc acid formic, bấy giờ xem như là có dung dịch chất điện ly.

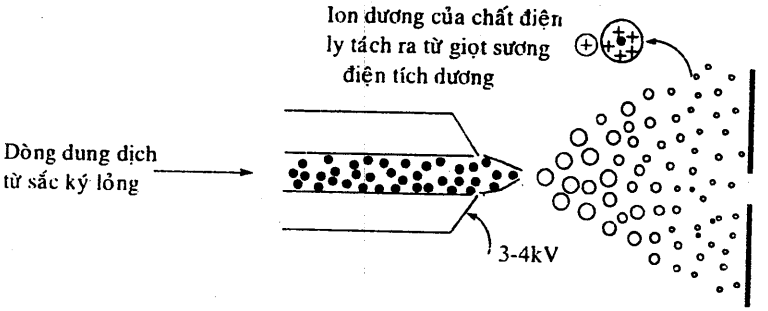
Pha động này được cho đi vào một ống mao quản làm bằng thép không rỉ, đường kính 0,1–0,5mm, và được phun sương ra khỏi ống vi quản với vận

tốc phun sương chậm 10-20 µl/phút, sương này sẽ đi vào một vùng có điện trường mạnh 3-6 kV (điện thế có thể dương hoặc âm tùy vào việc người ta muốn khảo sát ion âm hay ion dương), ở áp suất không khí, có nhiệt độ gần với nhiệt độ phòng.

Dưới ảnh hưởng của điện thế, tại đầu mao quản, dung dịch xuất hiện thành những giọt sương nhỏ, mang điện tích dương. Khí ở xung quanh các giọt này tạo một nhiệt năng làm bay hơi dung môi ra khỏi giọt sương. Ở vị trí càng xa lỗ phun sương, các giọt sương càng có kích thước nhỏ dần, điện tích càng tăng lên, hệ quả là những giọt sương mang nhiều điện tích sẽ kém bền, dẫn đến sự bùng nổ Coulomb (explode in a Coulombic explosion). Sự bùng nổ Coulomb nghĩa là các giọt sương sẽ thành lập nên những giọt sương nhỏ hơn nữa, nhỏ nữa... cho đến khi tạo thành ion.

Tiếp theo, các ion này được hút vào bộ phận phân tích khối phổ.

Đây là phương pháp ion hóa êm dịu vì chỉ cần cung cấp cho hệ thống một năng lượng nhiệt tương đối nhỏ. Khối phổ đồ không có sự phân mảnh.



Hình 23: Mô tả tổng quát sự tạo thành ion dương trong kỹ thuật ESI.

Một số yêu cầu trong kỹ thuật ESI.

* Các dung môi phù hợp để phun sương là: etanol, metanol, isopropanol, acetonitril, aceton, tetrahydrofuran, cloroform, diclorometan...

* Các phân tử của hợp chất cần khảo sát nhất thiết phải được biến đổi thành chất điện ly, tan trong dung dịch dùng để phun sương, điều này tùy thuộc vào: dung môi sử dụng, pKa của chất điện ly và pH của dung dịch.

* Pha động và các chất phân tích nhất thiết phải có tính phân cực, bởi vì pha động cần phải hòa tan các muối cần thiết để biến hợp chất phân tích thành ion.

- Các peptid, protein có thể được biến thành ion dương bằng cách hòa tan vào hỗn hợp đồng lượng metanol: dung dịch nước 5% acid acetic, để proton hóa các amino acid mang tính kiềm.

- Các hợp chất như polyetylenglycol có thể được cation hóa bằng cách cho tạo thành muối với natri hoặc kali.

Nhược điểm

Các hợp chất mà phân tử không mang những nhóm chức dễ dàng bị ion hóa, cũng có thể áp dụng kỹ thuật ESI bằng cách tạo muối với Na, K, amonium hoặc tạo thành ion âm với acetat. Tuy nhiên, sự hiện diện của các cation Na, K có thể đưa đến sự thành lập các sản phẩm cộng, gây phức tạp cho việc giải đoán cấu trúc hoá học.

Giải pháp: cần sử dụng phương pháp sắc ký cột, sử dụng một cột để loại bỏ muối trước khi đưa vào phân tích ESI.

Ưu điểm

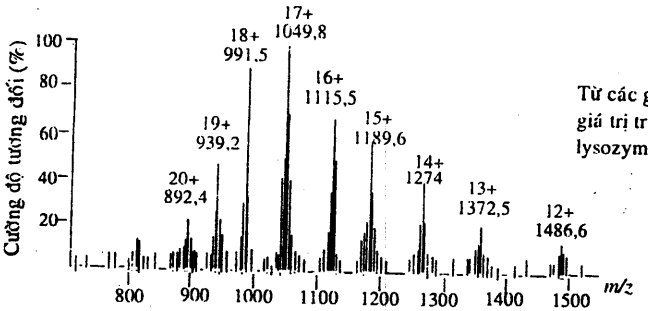
- Kỹ thuật ESI có thể tạo ion dương hoặc ion âm tùy vào việc áp cực điện thế.

- Kỹ thuật ESI ít cho phân mảnh ion, được xem là kỹ thuật ion hóa êm dịu hơn APCI, rất thích hợp để phân tích các hợp chất kém bền nhiệt, có tính phân cực, có khối lượng phân tử lớn (đo được các protein có khối lượng phân tử lớn hơn 130 Kdalton).

- Một đặc trưng của cách thức tạo thành ion như trình bày trên là để tạo ra những ion đơn điện tích (singly-charged ions), kỹ thuật này cũng tạo ra các ion đa điện tích trong trường hợp phân tử khảo sát có mang nhiều nhóm chức có khả năng bị ion hóa.

Với những phân tử lớn, mang nhiều tâm có thể nhận proton, ESI có thể tạo ra những ion phân tử $(M + nH)^{n+}$ khác nhau. Máy sẽ ghi một loạt những

mũi của ion phân tử tương ứng với $(M+nH)^{n+}$ / n (với n là số điện tích của ion).



Hình 24: Khối phổ đồ của hợp chất lysozyme ghi bằng kỹ thuật ion hoá ESI

- Các nghiên cứu cho biết tính trung bình, mỗi kiloDalton (kDa) khối lượng protein khảo sát có mang một điện tích. Vì thế nếu đầu dò khối phổ là loại tứ cực, chỉ khảo sát được các hợp chất có khối lượng phân tử trong một *khoảng nhỏ giới hạn,* không thể sử dụng máy này để ghi phổ khối lượng các đại phân tử protein. Tuy nhiên, vì nguyên tắc của máy khối phổ là ghi theo *tỉ lệ khối lượng trên điện tích (m/z),* nên kỹ thuật ion hoá ESI có thể giúp xác định khối lượng của một đại phân tử có khối lượng phân tử ***lớn hơn*** mức khối lượng phân tử mà máy khối phổ thường lệ có thể đo đạt.

Thí dụ một phân tử có trọng lượng phân tử 20 kDa, mang 20 điện tích, như vậy, *tỉ lệ khối lượng trên điện tích (m/z)* của phân tử này ***tương đương*** với phân tử có trọng lượng phân tử 1 kDa. Nhờ vậy có thể đo được trọng lượng phân tử của hợp chất này bằng một máy khối phổ với đầu dò tứ cực, sử dụng kỹ thuật ion hoá là ESI.

Khối phổ đồ trình bày bằng một loạt những mũi đa điện tích (multiply-charged peaks), mỗi mũi tương ứng cho một loại ion, như trình bày trong hình 24. Kỹ thuật cho biết được giá trị trung bình của khối lượng phân tử. Việc đo đạt *m/z* thêm chính xác hơn, so với trường hợp chỉ có một giá trị *m/z* của đơn điện tích.

3.8.4. Giao diện Chùm tia hạt (Particle Beam interface: PB)

Máy LC-MS với giao diện Chùm tia hạt là một giao diện bổ sung cho kỹ thuật tia nhiệt.

Pha động sắc ký lỏng (gồm hợp chất khảo sát và dung môi) vừa đi ra khỏi cột sắc ký (LC), được bơm dọc theo một mao quản để đến một ống phun sương bằng thủy tinh. Tại đây dung dịch lỏng được chuyển thành đám mù sương; những hạt sương nhỏ được phân tán nhờ một dòng khí helium. Khi đi ngang qua buồng đuổi dung môi, bụi sương được loại bỏ gần hết dung môi, tiếp theo, hạt bụi sương lại được kéo ngang qua những bộ phận phụ trợ để loại hết dung môi (bộ phận này được giữ ở áp suất và nhiệt độ phòng) trước khi đi vào buồng ion hóa của máy khối phổ.

Ưu điểm của giao diện PB là loại được hết dung môi để có thể thực hiện sự ion hóa bằng kỹ thuật EI hoặc CI; có thể chịu đựng được dòng chảy của máy sắc ký với vận tốc 0,3-1 ml/phút, chịu được bất kỳ loại dung môi pha động giải ly của LC (tuy vậy, nó không hiệu quả nếu pha động là loại dung dịch đệm không bay hơi).

4. ĐIỀU CHẾ CÁC HỢP CHẤT CẦN PHÂN TÍCH THÀNH CHẤT DẪN XUẤT

Các hợp chất phân tích cần được biến đổi thành chất dẫn xuất vì hai lý do sau.

- Không có đầu dò HPLC nào có thể được sử dụng để *phát hiện tất cả* các loại hợp chất vì thế với một đầu dò đang có, cần chuyển các chất khảo sát thành chất dẫn xuất phù hợp để gia tăng sự đáp ứng của chúng với đầu dò.

- Đối với đầu dò có sẵn, có thể biến chất cần khảo sát thành chất dẫn xuất để nó có thể đáp ứng áp đảo so với những chất không cần phân tích.

Có thể biến đổi chất dẫn xuất ***trước*** hoặc ***sau*** khi chất khảo sát đi vào cột sắc ký, với một số loại tác chất thường sử dụng

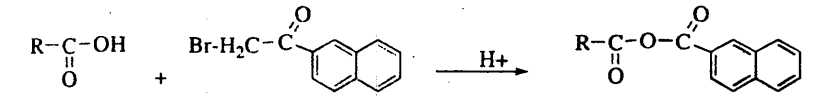
- Các hợp chất khảo sát không có tính huỳnh quang được cho tác dụng với tác chất để biến thành chất dẫn xuất có huỳnh quang.

- Các hợp chất khảo sát không hấp thu UV hoặc ánh sáng thấy được, được cho tác dụng với tác chất sinh màu (chromagenic) để biến thành chất dẫn xuất có thể hấp thu mạnh tia UV hoặc ánh sáng thấy được.

4.1. Tạo dẫn xuất trước khi hợp chất đi vào cột sắc ký

✳ Chất dẫn xuất có nhóm hàm sắc

Các hợp chất có mang nhóm chức acid carboxylic thường được cho tác dụng với bromur naptacyl để tạo thành dẫn xuất ester mà trong cấu trúc của nó có mang một nhóm hàm sắc (chromophore unit) nên dễ dàng hấp thu UV.

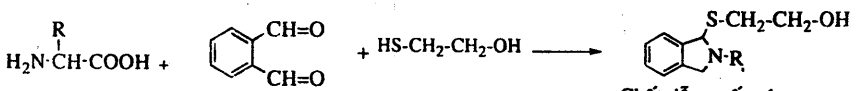


Acid carboxylic — Bromur naptacyl — Dẫn xuất hấp thu được UV

✳ Chất dẫn xuất có tính huỳnh quang

Muốn xác định các amino acid, có thể sử dụng kỹ thuật tạo chất dẫn xuất trước khi cho chất đi vào cột sắc ký và phát hiện bằng đầu dò huỳnh quang.

Phân tích amino acid bằng phương pháp tạo dẫn xuất trước khi hợp chất đi vào cột sắc ký được ưa chuộng hơn. Amino acid tác dụng với *orto*-phtaldehyd với sự hiện diện của một mercaptan, phản ứng xảy ra ở nhiệt độ phòng, tạo một dẫn xuất *iso*-indol có mang nhóm thế thio. Dẫn xuất này có tính huỳnh quang rất mạnh, có thể được phát hiện bởi đầu dò huỳnh quang.



Amino acid — *orto*-Phaldehyd — Chất dẫn xuất có tính huỳnh quang

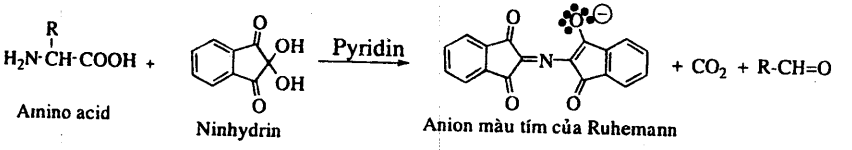
Qui trình điều chế dẫn xuất: Lấy 250 µl dung dịch *orto*-phtaldehyd (viết tắt là OPA) (60 mg OPA/10 ml metanol), rót vào 250 µl dung dịch đệm borat pH 9,4 rồi trộn đều. Thêm vào 25 µl dung dịch 2-mercaptoetanol, trộn đều.

Từ dung dịch trên, lấy 250 µl. Cho vào dung dịch này 25 µl dung dịch chứa hỗn hợp mẫu amino acid. Quay đều trong 2 phút để phản ứng xảy ra và rút lượng mẫu cần thiết để chích vào máy HPLC.

4.2. Tạo dẫn xuất sau khi hợp chất đã đi ra khỏi cột sắc ký

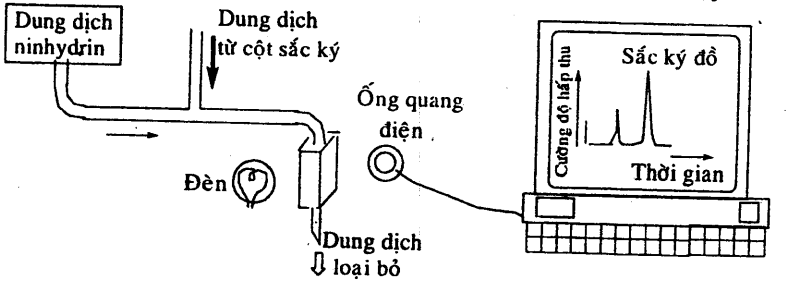
** Chất dẫn xuất có nhóm hàm sắc*

Hỗn hợp các amino acid được tách riêng ra từng loại amino acid nhờ cột sắc ký trao đổi ion, dung dịch giải ly chảy ra khỏi cột được cho tác dụng với dung dịch ninhydrin sẽ tạo thành chất dẫn xuất là một anion bền nhờ sự cộng hưởng, có màu tím đậm, được gọi là màu tím Ruhemann (Ruhemann's purple). Cấu trúc của chất dẫn xuất có nhóm hàm sắc nên sự hấp thu ánh sáng của hợp chất sẽ được đầu dò UV ghi nhận và chuyển thành các tín hiệu theo thời gian; cường độ của mỗi tín hiệu tỉ lệ thuận với nồng độ của amino acid có trong hỗn hợp phân tích.



Thời gian lưu của từng loại amino acid biết được nhờ so sánh với giá trị Rf của từng amino acid mẫu đã chuẩn bị trước đó.

Kỹ thuật này có nhược điểm là phải có bộ phận chuyên dụng gắn kèm với máy HPLC, thời gian phân tích lâu 1-8 giờ và qui trình kém nhạy.



Hình 25: Sơ đồ tổng quát của một máy phân tích amino acid, phát hiện chất nhờ tạo chất dẫn xuất sau khi hợp chất đã đi ra khỏi cột sắc ký

Có nhiều yếu tố để quyết định nên chọn cách điều chế dẫn xuất trước hoặc sau cột. Tạo dẫn xuất trước khi hợp chất đi vào cột sắc ký có thể thực hiện một cách thủ công, bên ngoài hệ thống máy HPLC và ít chịu các giới hạn về việc lựa chọn tác chất, loại dung môi, thời gian xảy ra phản ứng để tạo thành chất dẫn xuất.... Nhưng tất cả những yếu tố đó lại là các yêu cầu cần thiết cho trường hợp tạo dẫn xuất sau khi hợp chất đã đi ra khỏi cột sắc ký.

Tuy trường hợp *tạo dẫn xuất sau cột* có nhiều giới hạn về việc lựa chọn tác chất, loại dung môi, rồi phải tối ưu hóa các thông số như nhiệt độ phản ứng, nồng độ của tác chất, vận tốc dòng chảy của tác chất, thời gian để tác chất phản ứng với chất phân tích, nhưng kỹ thuật này có ưu điểm là dễ dàng xây dựng thành một bộ phận riêng để có thể ghép vào một hệ thống khép kín, thí dụ máy phân tích amino acid.

Việc phân tích định tính và định lượng với máy HPLC cũng giống như với máy sắc ký khí mặc dù có một vài khác biệt quan trọng.

Muốn định lượng cần phải xây dựng đường biểu diễn chuẩn nhờ vào những dung dịch có nồng độ biết trước, để biết được đáp ứng của đầu dò. Đường biểu diễn chuẩn phải có tính tuyến tính trong khoảng nồng độ mà mẫu cần phân tích đang có.

Máy HPLC cũng có thể sử dụng để cô lập hợp chất với cột nhồi định tính (đường kính trong của cột # 4,6 mm), mỗi lần chích dung dịch vào máy khoảng 5-20 µl để cô lập được < 5 mg, thực hiện lặp lại nhiều lần sẽ có thể thu được một lượng mẫu chất khá đủ để có các nghiên cứu chuyên sâu hơn. Nếu muốn có số lượng nhiều hơn cần sử dụng cột điều chế với cột có đường kính trong > 10 mm, cột nhồi với các hạt có đường kính > 50 µm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. **A. Braithwaite, F.J. Smith.** *Chromatographic methods.* Kluwer Academic Publishers. Boston-London. 1999.

[2. **David Sheenan.** *Physical biochemistry principles and applications.* John Wiley and Sons, LTD. New York. Singapore. Toronto. 2000.

[3. **Donald L. Pavia, Gary M. Lampman, George S. Kriz.** *Introduction to laboratory techniques. A contemporary approach.* Harcourt Brace College Publishers, Sydney, London, Tokyo. 1988.

[4. **John Kenkel.** *Analytical chemistry for technicians.* CRC Press LLC. Florida. 2003

[5. **Richard J.P. Cannell.** *Natural Products Isolation.* Humana Press, Totowa- New Jersey. 1998.

CÁC PHƯƠNG PHÁP CÔ LẬP HỢP CHẤT HỮU CƠ

Chương 9

ĐIỆN DI
(ELECTROPHORESIS)

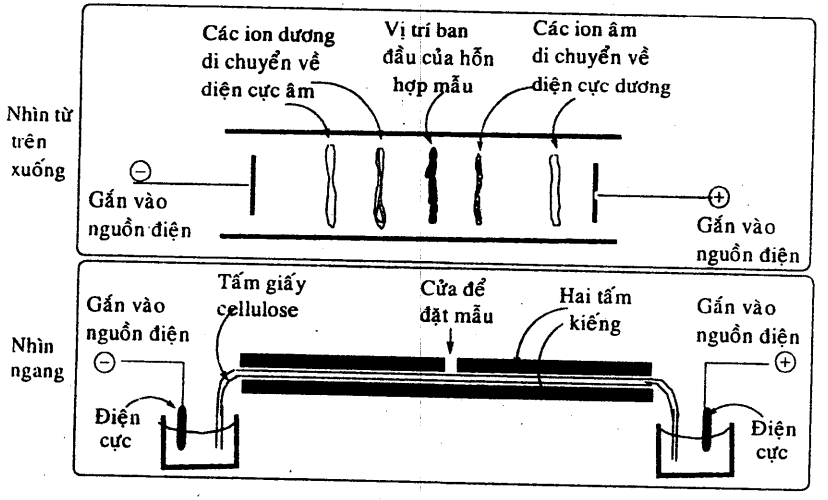
Điện di được biết từ năm 1937 bởi nhà bác học người Thụy Điển Arne Tiselius và từ đó, kỹ thuật điện di có nhiều cải tiến, nhất là môi trường điện di. Hiện đang thông dụng là điện di trên bản gel (gel electrophoresis) và gần đây là điện di trên ống vi quản (capillary tube electrophoresis). Khi thực hiện điện di trên một vi quản rất hẹp, có thể áp dụng một điện thế cao hơn thường lệ so với khi thực hiện điện di trên bản gel và như thế kết quả sẽ đạt cao hơn.

Điện di là kỹ thuật tách những hợp chất của một hỗn hợp nhờ điện trường. Điện trường là vùng không gian có mang điện tích, thí dụ là vùng nằm giữa hai điện cực nối vào một nguồn điện.

Nguyên tắc của điện di là dưới ảnh hưởng của một điện trường, những ion phân tử (hoặc các đại phân tử có những vị trí có mang điện tích) di chuyển với vận tốc khác nhau và theo hai hướng khác nhau trong dung dịch điện ly. Sự điện di xảy ra trong môi trường thường là cellulose hoặc gel có tẩm dung dịch.

Một máy điện di có nguyên tắc hoạt động giống như một bình điện giải hóa học. Một nguồn điện nối vào hai điện cực để tạo điện trường. Môi trường điện di và mẫu chất cần phân tích được đặt ở khoảng giữa hai điện cực.

Điện di dùng để tách các ion bởi vì chỉ có các ion mới có thể di chuyển dưới tác dụng của một điện trường: ion dương đi về điện cực âm và ngược lại, ion âm di chuyển về điện cực dương theo một hiện tượng gọi là lực hút tĩnh điện (electrostatic attraction).

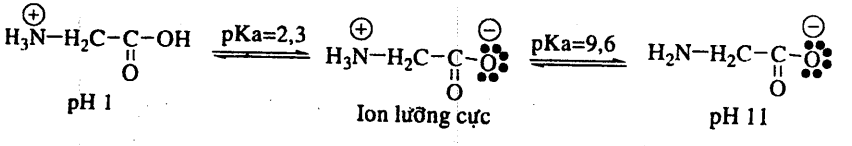


Hình 1: Mô tả tổng quát một máy điện di trên giấy

Các nhà khoa học thấy rằng điện di là kỹ thuật đặc biệt hữu ích để tách riêng những hợp chất của một hỗn hợp sinh hóa, thí dụ tách hỗn hợp các amino acid, cũng như các hợp chất sinh học khác như protein, acid nucleic...

Các phân tử phù hợp cho điện di là những loại hợp chất có mang các nhóm có tính acid hoặc tính base dễ dàng được ion hóa. Mức độ ion hóa tuỳ thuộc vào cấu trúc của hợp chất và pH của môi trường. Thí dụ các amino acid có hai giá trị pKa cho nên tuỳ vào pH của môi trường, amino acid hiện diện dưới dạng ion âm hoặc ion dương.

Thí dụ glycin hiện diện chủ yếu ở dạng ion nào là tùy vào pH, được minh họa trong hình sau



Dạng ion lưỡng cực của amino acid thường được gọi là zwitterion. Giá trị pH làm cho amino acid có điện tích toàn phần bằng zero được gọi là điểm đẳng điện (isoelectric point gọi tắt là pI). Khi môi trường có giá trị pH khác với pI, các amino acid và một số hợp chất tương tự có thể hiện hữu hoặc ở

dạng ion âm hoặc ion dương. Dưới sự tác dụng của một điện trường, những ion âm sẽ di chuyển về điện cực dương và ngược lại, những ion dương sẽ di chuyển về điện cực âm.

Phương pháp điện di cũng có thể áp dụng cho những hợp chất thuộc loại hydratcarbon, đường, sau khi đã được tạo thành các chất dẫn xuất borat hoặc phosphat.

Sự di chuyển của các ion được thực hiện trong môi trường dung dịch đệm để bảo đảm pH không đổi.

Nguyên tắc của sự tách hợp chất bằng điện di như sau.

a) Các ion mang điện tích ngược dấu nhau sẽ di chuyển theo hai hướng ngược chiều nhau và nhờ đó các hợp chất tách riêng ra.

b) Các ion mang điện tích cùng dấu, tuy di chuyển cùng chiều với nhau nhưng vì di chuyển với vận tốc khác nhau nên hệ quả là chúng sẽ tách rời nhau ra.

Vận tốc di chuyển tùy thuộc vào sự linh động tương đối (relative mobility) của các ion phân tử. Sự linh động của một ion tuỳ thuộc vào điện tích toàn phần của ion phân tử (net charge), tỉ lệ khối lượng/ điện tích (ratio of mass/ charge), kích thước và hình dạng của ion phân tử, nhiệt độ của môi trường điện di, độ rỗng và độ nhớn của môi trường điện di mà ion di chuyển ngang qua.

Môi trường điện di là những chất mang trơ như: giấy, gel agarose, acetat cellulose, acrylamid....

1. CÁC KIẾN THỨC CĂN BẢN VỀ ĐIỆN DI

1.1. Căn bản vật lý của điện di

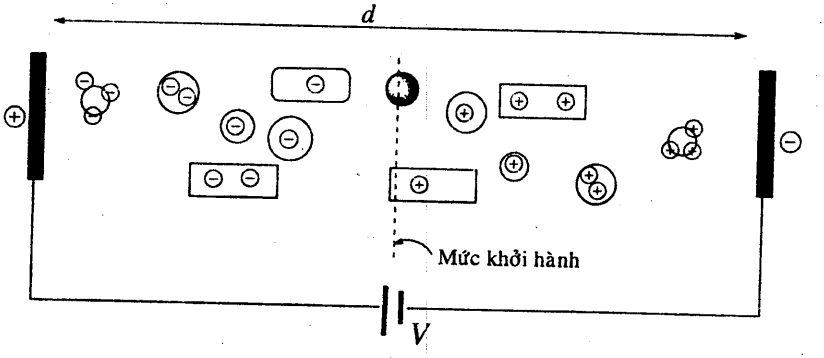
Một hỗn hợp các hợp chất sinh học có mang điện tích được đặt vào một điện trường với một lực điện trường E (field strength), các ion phân tử sẽ di chuyển về hướng điện cực ngược dấu với nó. Tuy vậy các phân tử khác nhau sẽ di chuyển với các vận tốc khác nhau tuỳ thuộc vào tính chất vật lý của phân tử cũng như điều kiện thực nghiệm.

Vận tốc di chuyển của một phân tử có điện tích được mô tả theo phương trình sau

(1) $$v = \frac{E\,q}{f}$$

v : Vận tốc di chuyển của phân tử trong điện trường
E : Lực điện trường
q : Điện tích toàn phần của phân tử
f : Hệ số ma sát

Hệ số ma sát tuỳ vào nhiều yếu tố: như khối lượng phân tử, mức độ chặt chẽ trong cấu trúc phân tử, độ nhớt của dung dịch đệm sử dụng, độ rỗng của hệ mạng môi trường điện di. Điện tích toàn phần được xác định bằng số điện tích âm và điện tích dương hiện diện trong phân tử. Phương trình (1) cho thấy phân tử sẽ di chuyển nhanh hơn nếu điện tích toàn phần lớn hơn.



Hình 2: Căn bản vật lý của điện di. Phân tử di chuyển trong điện trường có lực điện trường *E* tuỳ thuộc vào điện tích toàn phần, khối lượng phân tử và hình dạng của nó

Nhận xét: *Phân tử càng có nhiều điện tích, và kích thước càng nhỏ thì di chuyển càng nhanh về điện cực ngược dấu. Các phân tử có cùng điện tích nhưng hình dạng khác nhau sẽ di chuyển với vận tốc khác nhau.*

Trong thực nghiệm, điện trường được thiết lập bằng cách áp một điện thế V vào hai điện cực, đặt cách nhau một khoảng cách d; vì thế, lực điện trường sẽ là E = V/ d.

Một dòng điện được truyền tải giữa hai điện cực bởi những thành phần của dung dịch đệm, và nhờ dung dịch đệm nên pH của môi trường không thay đổi. Trong điện di giá trị pH không được thay đổi. Sự thay đổi pH sẽ làm

điện tích toàn phần của các phân tử khảo sát thay đổi theo, dẫn theo việc thay đổi về sự linh động của phân tử đó.

Trong điện di, hai loại dung dịch đệm được ưa chuộng là Tris-HCl hoặc Tris-glycin.

Định luật Ohm cho biết mối liên quan giữa V, dòng điện I và điện trở R.

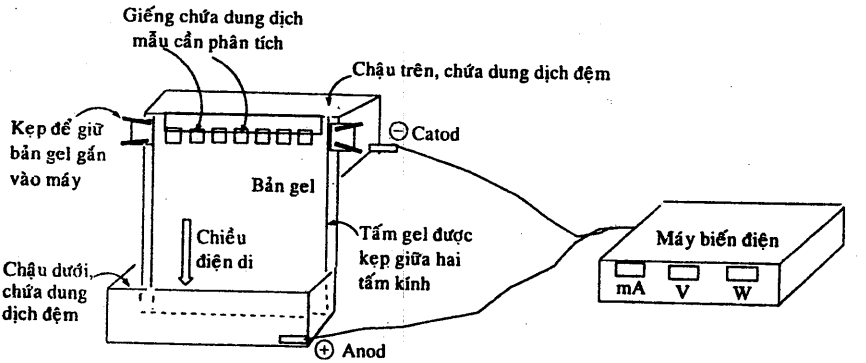
$$V = R. I$$

Khi gia tăng V, dòng điện mạnh hơn khiến cho phân tử di chuyển nhanh hơn. Tuy nhiên, thực nghiệm cho thấy việc sử dụng điện thế lớn, tạo ra nhiệt trong hệ thống.

$$W (watt) = I^2. R.$$

Nhiệt tạo ra ảnh hưởng đến quá trình tách các hợp chất: nhiệt cao có thể làm hư hại cấu trúc phân tử khảo sát như protein, acid nucleic... Nhiệt tăng cao sẽ làm giảm độ nhớt của dung dịch đệm, điều này có nghĩa là làm giảm điện trở R. Khi điện trở R giảm, với trường hợp điện thế không đổi, dòng điện I tăng, sẽ phát sinh thêm nhiệt.

Trong thực nghiệm, điện thế luôn được giữ không đổi nhờ một máy ổn áp. Một vài trường hợp thực nghiệm điện di với cường độ dòng điện không đổi.



Hình 3: Máy điện di cỡ nhỏ, với bản gel được đặt dựng đứng

1.2. Các yếu tố ảnh hưởng lên vận tốc điện di

1.2.1. Điện trường

Điện trường là dαV/L (với V: điện thế volt; d: khoảng di chuyển; L: khoảng cách giữa 2 điện cực). Volt càng tăng tuyến tính thì khoảng di chuyển càng lớn. Vận tốc di chuyển sẽ nhanh chóng đạt đến một giá trị không đổi (tốc lực cuối) khi không còn một lực thực sự nào tác dụng lên những ion có mang điện tích; lực ma sát tạo ra do các ion di chuyển xuyên qua môi trường sẽ cân bằng với lực điện thế áp dụng. Như vậy, với những loại nhóm hợp chất có cùng điện tích, tốc lực cuối đạt được là do hình dạng và kích thước của những loại này.

Phân tử càng lớn, sự ma sát càng nhiều, sự tương tác tĩnh điện càng chậm trễ và như thế sẽ di chuyển càng chậm. Tuy nhiên, các phân tử có cùng kích cỡ thể tích, nhưng có thể có hình dạng khác nhau: thí dụ protein có hai loại là hình cầu và hình sợi, nên sẽ có đặc điểm di chuyển khác nhau.

1.2.2. Dung dịch đệm

Tại điểm đẳng điện, các amino acid là chất lưỡng cực (switterion), không thể di chuyển trong điện trường. Tuy nhiên, nếu môi trường có tính acid nhẹ, các amino acid hiện hữu ở dạng proton hóa nên có thể di chuyển về catod. Cũng tương tự ngược lại, nếu môi trường có tính base nhẹ, các amino acid có thể di chuyển về anod. Như vậy, pH của môi trường quyết định chiều hướng di chuyển.

Có nhiều loại dung dịch đệm hữu cơ và vô cơ như: EDTA, phosphat, tris, citrat, barbiton, acetat, pyridin.... Sử dụng borat như chất điện ly để thực hiện sự điện di đối với các chất carbohydrat, các polyalcol. Các hợp chất loại này sẽ kết hợp với tác chất borat để tạo thành những phức ion, thí dụ borat cetyltrimetylammonium.

Một số dung dịch đệm thường sử dụng: tris -glycin (pH 8,3 – 9,5); tris -borax (pH 8,3 – 9,3); tris - acetat natri (pH 7,2 – 8,5); tris - citrat (pH 7,0 – 8,5).

Vận tốc di chuyển của các chất tan (solutes) được kiểm soát bởi pH và nồng độ của chất điện ly (do lực ion). Khi lực ion của dung dịch đệm tăng, nó

sẽ mang theo một lượng điện tăng tương ứng và đồng thời việc tải chất sẽ giảm. Điều kiện điện di như thế sẽ cho kết quả là những dãy băng gọn đẹp, nhưng mất nhiều thời gian. Hệ thống máy sẽ bị nóng lên, làm dung dịch điện ly bay hơi bớt. Nên tránh dùng chất điện ly có nồng độ quá đậm đặc. Tuy nhiên, nếu dung dịch quá loãng, thời gian di chuyển sẽ ngắn, nhưng cho kết quả là những dãy băng phân tán, không sắc nét.

Đa số các protein đều có điểm đẳng điện (pI) ở khoảng 4-7, vì thế, dung dịch đệm thường chọn vào khoảng pH 8,0 -9,5. Lý tưởng nhất là làm sao có thể thực hiện sự điện di ở pH gần với điểm đẳng điện pI của chúng, như thế sự khác biệt về điện tích giữa các protein sẽ nhỏ, khả năng tách chúng sẽ lớn.

Các protein rất nhạy cảm với lực ion, loại ion và các yếu tố khác của dung dịch đệm. Về mặt tổng quát, dung dịch có lực ion thấp (nghĩa là lực dẫn điện nhỏ) là có thể phù hợp. Tuy nhiên, nếu lực ion quá nhỏ, sẽ có hiện tượng protein kết tụ.

Nồng độ của dung dịch đệm tốt nhất là trong khoảng 0,05–0,1 M.

1.2.3. Môi trường chất mang (Supporting media)

Có nhiều loại chất mang cũng như các máy móc thiết bị đã được thiết kế để dùng cho việc điện di. Các chất mang được sử dụng dưới dạng là một dãy băng, chất gel, lớp mỏng. Các chất mang có thể trung tính hoặc có thể có những ảnh hưởng vật lý lên quá trình tách chất. Các nguyên liệu dùng làm chất mang trong điện di như: giấy lọc, acetat cellulose, gel tạo thành từ tinh bột, từ agar, từ polyacrylamid, một lớp mỏng silica và alumina.

Dựa vào sự khác nhau của môi trường điện di, các nhà khoa học chia điện di làm ba loại: điện di trên giấy (paper electrophoresis), điện di trên bản gel (gel electrophoresis) và điện di trên ống vi quản (capillary tube electrophoresis). Từ sự khác nhau trên, bản chất của chất điện ly và pH của môi trường cũng thay đổi khác nhau.

a) Giấy

Giấy lọc Whatman số 1 và số 3 MM cắt thành những dãy băng có chiều rộng 3-5 cm, rất tiện dụng cho các loại điện di sử dụng dung dịch đệm

có nước. Dùng giấy số 3 có độ chặt chẽ cao, nên nó sẽ cho dòng điện đi qua cao hơn khi dùng giấy số 1 (cùng một mức volt).

Sử dụng giấy có ưu điểm là rẻ, kinh tế, tiện dụng, nhưng khó áp dụng cho một số loại phân tử như protein hoặc những đại phân tử có tính thân dầu (hydrophilic) vì giấy sẽ hấp thu nên kết quả là các dãy băng bị kéo thành vệt dài.

b) Acetat cellulose

Trong chuỗi acetat cellulose, mỗi đơn vị glucose chứa 2 hoặc 3 nhóm acetyl, có tính hấp thu ít hơn giấy, nên người ta ưa dùng những dãy băng làm bằng acetat cellulose. Khi áp dụng cho các loại phân tử như protein hoặc những đại phân tử có tính thân dầu (hydrophilic), cho kết quả là các dãy băng sắc nét, không có hiện tượng bị kéo thành vệt dài.

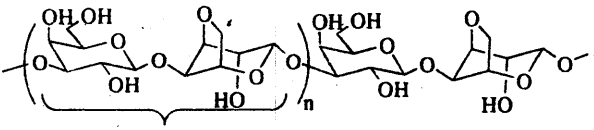
Acetat cellulose mặc dù đắt tiền nhưng vẫn được sử dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm y khoa trong việc phân tích những mẫu protein sinh vật.

c) Gel tinh bột

Để điều chế gel tinh bột, người ta đun một huyền phù tinh bột dạng hạt trong dung dịch đệm để có một chất keo trong. Dung dịch sệt này trong quá trình để nguội sẽ tạo thành gel nửa cứng (semisolid) là do những chuỗi amylopectin nối mạng ngang, tạo nên những lỗ rỗng. Độ rỗng thay đổi tùy theo tỉ lệ phần trăm của tinh bột trong dung dịch đệm. Dung dịch 15% tạo gel có lỗ nhỏ nhất, dung dịch 2% tạo gel có lỗ lớn nhất. Tuy nhiên, rất khó chế tạo gel đồng đều cho mỗi lần pha chế.

d) Agarose

Hiện nay người ta thường sử dụng ***agarose*** là một hệ mạng gel polysacarid. Hệ polymer này gồm nhiều đơn vị disacarid, với tên gọi là agarobiose, bao gồm galactose và 3,6-anhydrogalactose. Agarose cho mạng gel đồng nhất và được sử dụng để tách AND.



Agarobiose

e) Gel polyacrylamid

Gel polyacrylamid là sự polymer hoá của monoacrylamid với sự hiện diện của chất tạo mạng *N,N'*-metylenbisacrylamid. Khi hoà tan trong nước, chất xúc tác persulfat amonium biến thành gốc tự do ($S_2O_8^{2-} \rightarrow 2\ SO_4^{2-}$), gốc tự do này xúc tác acrylamid kết thành chuỗi dài. Dung dịch chuỗi polymer này tuy rất nhớt nhưng tạo thành gel vì các dây có thể trượt lên nhau. Để tạo gel, cần có *N,N'*-metylenbisacrylamid để nối mạng ngang các chuỗi dây trên lại với nhau. Hợp chất *N,N,N',N'*-tetrametylendiamin, gọi tắt là TEMED, được cho thêm vào với nồng độ 0,4 % để thúc đẩy quá trình polymer hoá.

Hệ gel này có tính bền cơ học và trơ về mặt hóa học, với kích thước các lỗ rỗng có thể kiểm soát được.

Loại gel này có nhiều ưu điểm là có thể thay đổi độ rỗng lớn nhỏ khác nhau nên có thể tách những phân tử có cùng điện tích nhưng có kích thước và hình dạng khác nhau; tạo lỗ rỗng đồng đều cho mỗi lần pha chế nên cho các dãy băng luôn đồng nhất, rất tiện dụng trong nhiều kỹ thuật khác nhau.

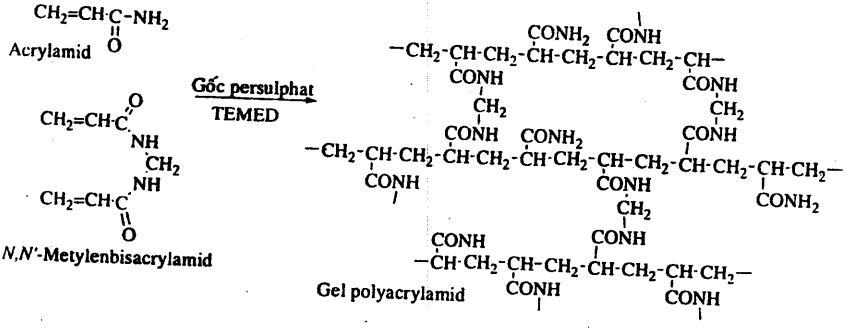
Có thể chế tạo một bản gel với phần trên bản gel có lỗ rỗng kích cỡ to nhưng xuống dưới thấp của bản, gel có lỗ rỗng nhỏ dần đều, dùng để xác định trọng lượng phân tử, nhất là các phân tử protein; hoặc để xác định điểm đẳng điện.

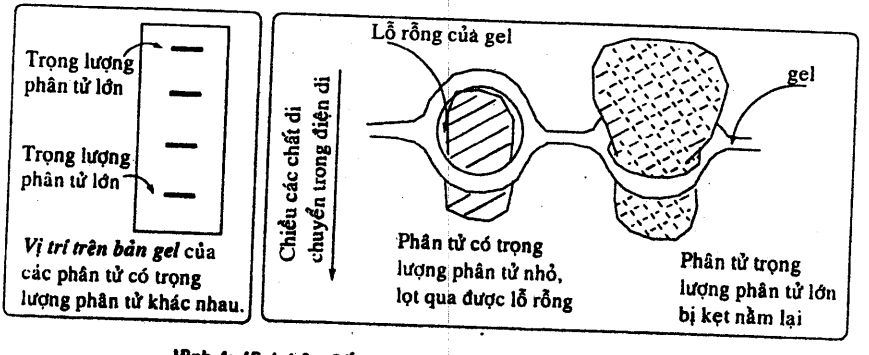
Có thể sử dụng bản gel đặt nằm ngang hoặc đặt thẳng đứng.

Có thể điều chế gel ở một nồng độ nhất định hoặc có nồng độ tăng dần tuyến tính. Nồng độ của acrylamid sẽ tạo gel có lỗ rỗng kích cỡ khác nhau. Gel có nồng độ ít hơn 2,5 % được sử dụng để tách các protein có trọng lượng phân tử khoảng 1.000.000 và gel có nồng độ 30% được sử dụng để tách các protein có trọng lượng phân tử khoảng 2.000.

Gel polyacrylamid có giá trị khác nhau về T% (nồng độ polyacrylamid của gel) và C% (Độ tạo mạng của gel) sẽ khác nhau về kích thước lỗ rỗng trong bản gel, độ cứng, độ bền, đặc tính trương nở của bản gel.

Bảng 1 cho biết mối liên quan tuyến tính về T%, C% của gel và trọng lượng phân tử của các hợp chất.





Hình 4: ***Hình trên:*** **Cấu trúc hóa học của gel polyacrylamid.**

Hình dưới: **Biểu diễn một phân tử có trọng lượng phân tử lớn, bị kẹt nằm lại trên bản gel. Bản gel với phần trên là gel có lỗ rỗng kích cỡ to, nhưng xuống dưới thì gel có lỗ rỗng nhỏ dần đều, dùng để xác định trọng lượng phân tử**

Bảng 1: Mối liên quan tuyến tính về T%, C% của gel và trọng lượng phân tử của các hợp chất điện di với bản gel đó.

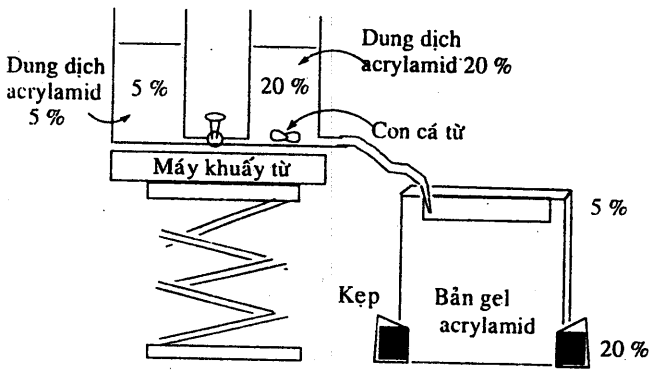
T: Nồng độ polyacrylamid của gel.

$$T\% = \frac{\text{Acrylamid (g) + Bis (g)}}{\text{100 ml dung dịch gel}} \times 100$$

C: Độ tạo mạng của gel

$$C\% = \frac{\text{Bis (g)}}{\text{Acrylamid (g) + Bis (g)}} \times 100$$

% T	% C	Trọng lượng phân tử của các hợp chất
< 2,5	2,7	1.000.000
5	2,7	25.000 – 300.000
7	2,7	100.000
10	2,7	15.000 – 70.000
15	2,7	12.000 – 50.000
30	2,7	2.000
7 -25	1,0	14.300 – 330.000
5 – 20	2,6	14.300 – 210.000
3 - 30	8,4	13.000 – 950.000



Hình 5: Dụng cụ chế tạo bản gel với nồng độ acrylamid giảm dần gradient từ trên xuống dưới. Hai dung dịch có nồng độ 5% và 20% được trộn với nhau nhờ một máy trộn theo qui tắc bình thông nhau và cho chảy hỗn hợp dung dịch vào bản

1.3. Hiện hình bản gel

Sau khi thực hiện điện di, sự hiện diện của các hợp chất được nhận biết bằng cách nhuộm màu bản gel, tương tự như làm hiện hình bản sắc ký lớp mỏng bằng các thuốc thử đặc trưng.

Bảng 2 trình bày các thuốc thử hiện hình bản gel.

Các phân tử DNA có thể dễ dàng nhận bằng đèn UV nếu khi điện di có sự hiện diện của chất huỳnh quang bromur ethidium. Trái lại, với các acid nucleotic, sau khi điện di, có thể ngâm bản gel trong dung dịch bromur ethidium.

Protein thường được hiện hình bằng thuốc thử Coomassie blue. Thuốc thử Ponceau red kém nhạy nhưng có ưu điểm là loại thuốc nhuộm thuận nghịch, có thể loại thuốc thử khỏi protein để có thể thực hiện các nghiên cứu tiếp theo trên protein.

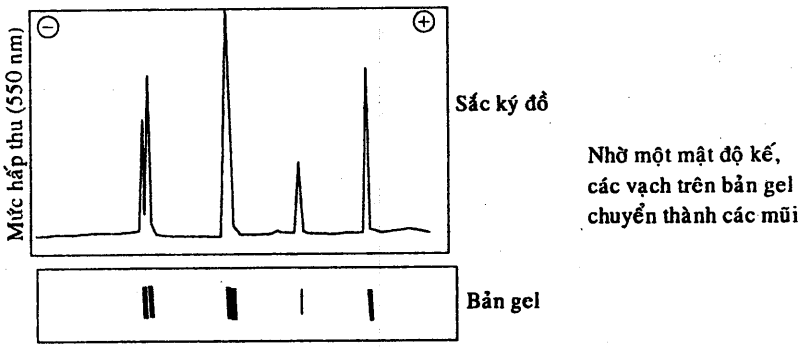
Thuốc thử protein nhạy nhất là thuốc bạc. Ngâm bản gel trong dung dịch $AgNO_3$ cho kết tủa kim loại bạc (Ag^0) tại các vùng có sự hiện diện của protein hoặc DNA, tạo thành vùng màu đen. Thuốc nhuộm này có nhược điểm là sau khi nhuộm màu, cần phải qua nhiều công đoạn rửa bản gel tốn nhiều công so với nhuộm bằng các thuốc thử khác, nhưng có ưu điểm là có thể phát hiện các protein mà các loại thuốc nhuộm khác không thể làm hiện màu.

Với bản gel điện di, có thể định lượng các hợp chất hiện diện nhờ một mật độ kế (densitometer), là một loại quang phổ kế. Máy đo mức hấp thu quang ở một bước sóng xác định của mỗi dãy băng trên bản gel, tương tự như sắc ký đồ từ máy HPLC.

Bảng 2: Một số thuốc thử thông dụng để hiện hình bản gel sau khi điện di trên gel agarose hoặc polyacrylamid.

Thuốc hiện hình	Loại chất phát hiện	Giới hạn phát hiện (ng)
Amino black	Protein	400
Coomassie blue	Protein	200

Ponceau red (thuốc nhuộm thuận nghịch)	Protein	200
Bis-1-anilino-8-naptalen sulfonat (ANS)	Protein	150
Nile red	Protein	20
SYPRO orange	Protein	10
Fluorescamin (xử lý protein trước khi điện di)	Protein	1
Nitrat bạc	Protein/ DNA	1
SYPRO red	Protein	0,5
Bromur ethidium	DNA/ RNA	10



Hình 6: Mật độ kế chuyển các vạch trên bản gel thành các mũi trên sắc ký đồ

1.4. Điện di với pH liên tục. Điện di với pH không liên tục

Trong kỹ thuật điện di cổ điển, môi trường điện di có pH liên tục, sau đó, môi trường được cải tiến để gia tăng khả năng tách của bản gel, đó là hệ thống bất liên tục (discontinuous system).

Môi trường điện di có pH bất liên tục, gồm hai lớp gel khác nhau có pH ban đầu hoàn toàn khác nhau, được đặt liền kề nhau.

• Lớp gel phía trên, có chiều cao khoảng một phần năm tổng chiều cao bản gel. Gel này có nồng độ polyacrylamid loãng 3-5 %, được pha bởi dung

dịch đệm 140 mM Tris-HCl ở pH = 6,9. Gel có lỗ rỗng to, lực ion yếu, pH gần như trung tính. Lớp này được gọi là "lớp gel chồng đống mẫu"" (stacking gel, có thể gọi là lớp gel chuẩn bị).

• Lớp gel phía dưới có chiều dầy là hai phần năm bản gel còn lại, gel có nồng độ polyacrylamid đậm hơn, 8-20 %, được pha bởi dung dịch đệm 350 mM Tris-HCl ở pH= 8–9. Gel có lỗ rỗng nhỏ, lực ion mạnh, có pH tính base. Lớp gel này được gọi là "lớp gel phân tách mẫu" (resolving gel).

Lực ion yếu của lớp stacking gel khiến cho điện trở tăng cao, nên sẽ chịu một lực điện trường mạnh hơn, như thế, cùng với một điện thế cố định như nhau, các mẫu ở vùng gel chồng đống mẫu sẽ chịu sự dồn ép mạnh hơn khi mẫu ở vùng gel phân tách. Nhờ thế, dung dịch mẫu được đậm đặc hơn, chồng đống thành những dãy băng hẹp, tập trung tại giao diện của hai lớp gel, chuẩn bị đi xuyên qua vùng gel có lỗ rỗng nhỏ, để các ion này sẽ tách rời nhau ra tùy theo tỉ lệ giữa khối lượng/ điện tích cũng như hình dạng và kích thước của các ion đó.

Dung dịch mẫu chất được đặt vào các lỗ giếng tạo sẵn trên gel. Mẫu được hòa tan trong dung dịch đệm loại sử dụng để điện di, gồm Tris-glycin ở pH = 8-9.

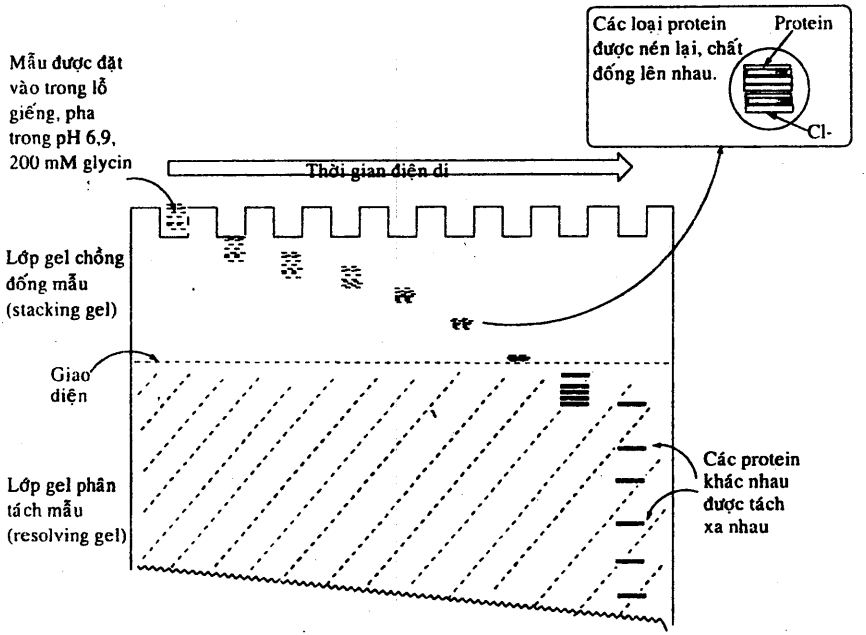
$$\underset{\text{Dạng lưỡng cực}\ \text{pH= 6,9}}{H_3\overset{\oplus}{N}-CH_2-COO^{\ominus}} \longrightarrow \underset{\text{Dạng anion (Ion glycinat)}\ \text{pH= 8-9}}{H_2N-CH_2-COO^{\ominus}} + H^{\oplus} \qquad (2)$$

Khi dung dịch mẫu đi vào phần gel chồng đống, có pH= 6,9; môi trường này làm glycin có khuynh hướng dịch chuyển mạnh về chiều tạo ra dạng lưỡng cực, không mang điện tích. Dạng này không di chuyển, không hoạt động trong điều kiện điện di. Mà nhiệm vụ của ion dung dịch đệm là mang dòng điện trong hệ thống điện di, để duy trì dòng điện với cường độ không đổi, cần phải có một luồng anion. Ở pH 6,9, đa số các protein hoặc acid nucleic hiện diện ở dạng anion, các anion này cùng với ion clorur Cl^- thay thế ion glycinat làm nhiệm vụ chuyển tải dòng điện.

Trong thực nghiệm, các ion protein /acid nucleic bị kẹp ở giữa (giữa ion clorur linh động và một lượng nhỏ ion glycinat kém linh động), biến

thành những lớp như bánh sandwich. Hiện tượng bị xếp thành lớp như bánh sandwich giữa những ion có độ linh hoạt khác nhau trong điện di được gọi là *sự đẳng tốc độ trong điện di* (isotachophoresis).

Ion clorur là nguyên tử có độ âm điện mạnh nên sẽ di chuyển về anod với vận tốc nhanh hơn nhiều lần so với các bất kỳ loại ion nào trong điện di. Dãy băng anion này sẽ tạo ra phía sau lưng nó một vùng có độ dẫn điện kém; khi vùng này đi xuyên qua phần còn lại của dung dịch mẫu, các phân tử trong dung dịch mẫu được sắp xếp lại dựa theo thứ tự từ loại phân tử có nhiều điện tích âm nhất cho đến phân tử có ít điện tích âm nhất. Điều này làm cho dung dịch mẫu biến thành nhiều lớp mỏng, chồng đống lên nhau.



Hình 7: Điện di với gel pH bất liên tục. Dung dịch mẫu (50 µl) được đặt vào trong lỗ giếng nhỏ ở phần "gel chồng đống". Khi dòng điện được nối vào hệ thống, các phân tử protein/ acid nucleic được nén chất chồng đống lên nhau trong phần stacking gel, di chuyển đến giao diện, đi vào phần gel phân tách mẫu, chúng sẽ tách xa nhau ra

Khi các lớp chồng đống này di chuyển đến vùng giao diện, chạm đến phần gel có pH = 8-9, sẽ có sự gia tăng nồng độ các ion glycinat một cách bất thường, như trong phương trình (2) và bấy giờ sẽ vận chuyển một dòng điện lớn. Cùng lúc đó, các ion protein/acid nucleic gặp polyacrylamid có nồng độ đậm đặc hơn, có lỗ rỗng nhỏ hơn, pH tính base nhiều hơn (hoạt động với chức năng như một rây lọc phân tử của gel), nên các lớp protein/acid nucleic sẽ tách xa nhau ra.

1.5. Cô lập hợp chất nhờ điện di

Sau khi điện di, có thể cô lập các hợp chất tách ra bằng điện di để tiếp tục các nghiên cứu khác nữa.

Thực hiện bằng cách cắt phần bản gel, lấy dãy gel có chứa một loại phân tử. Nghiền nhuyễn phần gel, các polypeptid được giải ly bằng cách khuyếch tán vào một dung dịch đệm chứa 0,1% SDS. Các polypeptid này được làm đậm đặc lại bằng cách cho trầm hiện với aceton, và hầu hết SDS đã được loại bỏ. Hoặc loại bỏ SDS bằng nhựa trao đổi ion Dowex.

Tái sinh tính chất nguyên thủy của polypeptid bằng cách hoà tan chất trầm hiện vào guanidin, clorhydrat.

2. ĐIỆN DI LÀM BIẾN TÍNH MẪU PHÂN TÍCH

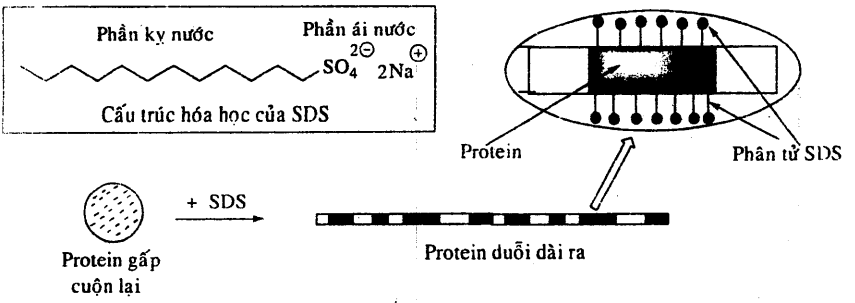
Các polymer sinh học thí dụ như protein, acid nucleic có cấu trúc tứ cấp trong không gian ba chiều là một khối chặt chẽ: chuỗi dây dài gấp nếp lại thành nhiều khúc và các khúc này được giữ lại gần bên nhau bởi nhiều loại nối như nối hóa trị, nối ion, nối hydrogen...

Trong điều kiện không biến tính, các hợp chất có cấu trúc như vừa trình bày, sẽ di chuyển nhờ vào điện tích thực đúng của nó.

2.1. Điện di với gel SDS polyacrylamid (gọi tắt là SDS-PAGE)

Chất hoạt động bề mặt sodium dodecyl sulfat (SDS) là một hợp chất có dây alkyl dài 12 carbon có tính kỵ nước và một đầu mang nhóm sulfat phân cực. Phần mạch dây kỵ nước của SDS có thể đan xen vào những vùng kỵ nước của protein theo như hoạt tính của loại chất hoạt động bề mặt, làm phá vỡ cấu trúc cuộn tròn chặt chẽ của protein và tạo thành một phức protein-

SDS. Đầu sulphat của SDS vẫn còn tiếp xúc với nước và như thế phức "SDS-protein" luôn được duy trì ở trạng thái hòa tan tốt.



Hình 8: Sự tương tác giữa protein với các phân tử sodium dodecyl sulphat. Chất hoạt động bề mặt SDS tương tác với phân tử protein cuộn tròn lại bằng cách bao phủ các vùng kỵ nước của polypeptid và để các đầu sulphat hướng ra bên ngoài

Về mặt thực nghiệm, SDS đã loại bỏ sự khác biệt về điện tích giữa các loại đại phân tử trong dung dịch. Protein được SDS bao bọc đều ở bên ngoài, thành một lớp che phủ đồng nhất, lớp này có điện tích âm. Các phức "protein-SDS" có điện tích toàn phần giống nhau. Phức "protein-SDS" hoạt động như một điện tích âm.

Kỹ thuật này đưa đến việc tách các đại phân tử dựa vào kích thước phân tử của chúng, bất kể tổng điện tích của protein là bao nhiêu.

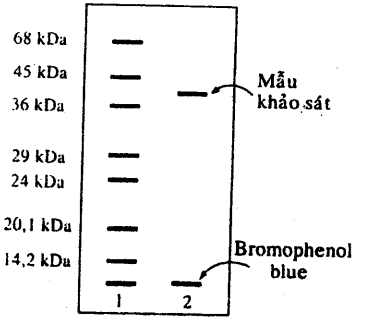
Kỹ thuật điện di này được gọi là điện di với gel polyacrylamid có SDS (SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE).

Kỹ thuật SDS-PAGE thường được sử dụng để biết trọng lượng phân tử của một protein.

Thực hiện điện di đồng thời hai mẫu: mẫu protein cần khảo sát, đặt trong một lỗ giếng và hỗn hợp các protein chuẩn được đặt trong lỗ giếng ở kề bên. Trong dung dịch đệm để pha mẫu, luôn cho thêm bromophenol. Hợp chất này có màu xanh dương nên trong quá trình điện di, sự hiện diện của màu xanh này giúp cho biết mức di chuyển của mẫu chuẩn cũng như của mẫu khảo sát ở trên bản gel. Khi các mẫu này xuống gần đến đầu bản gel ở

dưới thấp, cho ngừng dòng điện lại, chấm dứt quá trình điện di, nếu không các hợp chất sẽ tiếp tục đi xuống và chạy ra khỏi bản gel, hoà lẫn vào trong dung dịch đệm.

Đo khoảng đường di chuyển của mỗi loại protein chuẩn, để thiết lập đường chuẩn là đồ thị của trọng lượng phân tử theo đoạn đường di chuyển của protein trên bản gel.



Một số protein chuẩn với trọng lượng phân tử xác định

	Đơn vị (kDa)
Phosphorilase b	94
Bovine serum albumin	68
Ovalbumin	45
Glyceraldehyd 3-phosphat dehydrogenase	36
Carbonic anhydrase	29
Trypsinogen	24
Soja bean trypsin inhibitor	20,1
α-Lactabumin	14,2

Hình 9: SDS-PAGE (15 %) của một protein chưa biết trọng lượng phân tử

Các protein chuẩn được đặt vào lỗ giếng số 1, mẫu khảo sát được đặt tại lỗ số 2. Điện di trong 3 giờ ở 175 V. Sau khi điện di, bản gel được nhuộm màu bằng thuốc thử Coomassie blue. Bromophenol blue được sử dụng như thuốc nhuộm dẫn đường (tracker dye) để cho biết mức di chuyển của các hợp chất trên bản gel

Tuy SDS-PAGE được sử dụng rộng rãi nhưng nó cũng có nhược điểm.

✳ Kỹ thuật này xem các protein như có dạng hình cầu tròn, với điện tích được phân bố đều đặn trên mặt cầu. Nếu protein không đạt dạng hình cầu, sự phỏng đoán trọng lượng phân tử sẽ không chính xác. Do các đại phân tử sinh học được sắp xếp theo hai dạng hình cầu và hình sợi, vì thế, tuỳ vào protein khảo sát có dạng hình cầu hoặc dạng hình sợi, chọn các protein chuẩn có dạng bề ngoài đồng dạng.

✳ Trong điện di SDS-PAGE, các hợp chất glycoprotein có thể cho sự dị thường là vì SDS không gắn vào phần đường mà chỉ gắn vào phần protein của phân tử glycoprotein. Sự giảm điện tích sẽ làm giảm độ dịch chuyển, các

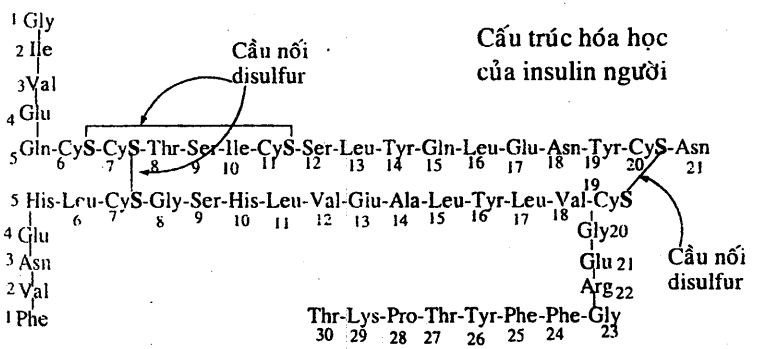
glycoprotein di chuyển chậm hơn so với các protein có trọng lượng phân tử tương ứng, kết quả sẽ nhận được trọng lượng phân tử cao hơn thực tế.

Tuy vậy, có thể khắc phục bằng cách tăng nồng độ polyacrylamid của gel, lúc đó sự lựa chọn bằng kích thước sẽ giữ vai trò áp đảo, khống chế được sự ảnh hưởng bởi điện tích; trọng lượng biểu kiến sẽ giảm và sẽ đạt được trọng lượng phân tử thật.

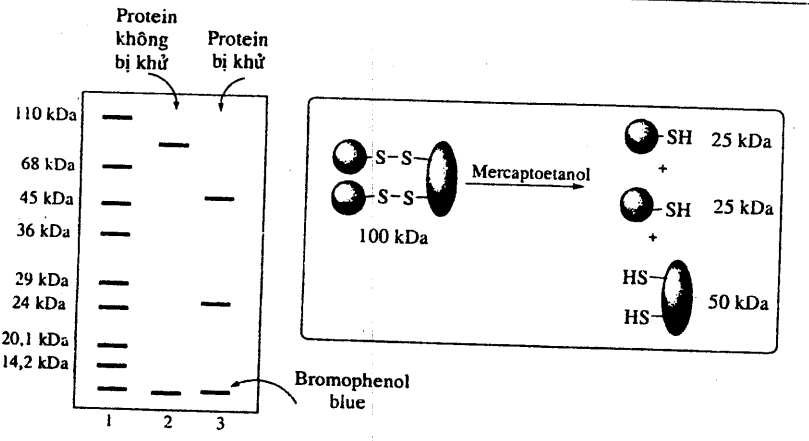
2.2. Điện di với gel SDS polyacrylamid trong điều kiện khử

Nhiều loại protein nhất là loại được tiết ra từ bên ngoài tế bào, thí dụ insulin người với cấu trúc của phân tử có chứa các nối disulfur. Các nối disulfur được tạo thành giữa hai nhóm mạch nhánh sulphydryl –SH của hai đơn vị cystein. Hai cystein có thể ở trong cùng một dây polypeptid (intrachain) hoặc giữa hai dây polypeptid khác nhau (interchain). Cầu nối disulfur là một dạng quan trọng của cấu trúc tứ cấp của protein bởi vì chính chúng đã tạo ra các hình dạng đặc thù cho từng loại protein cũng như góp phần tạo sự bền cho protein.

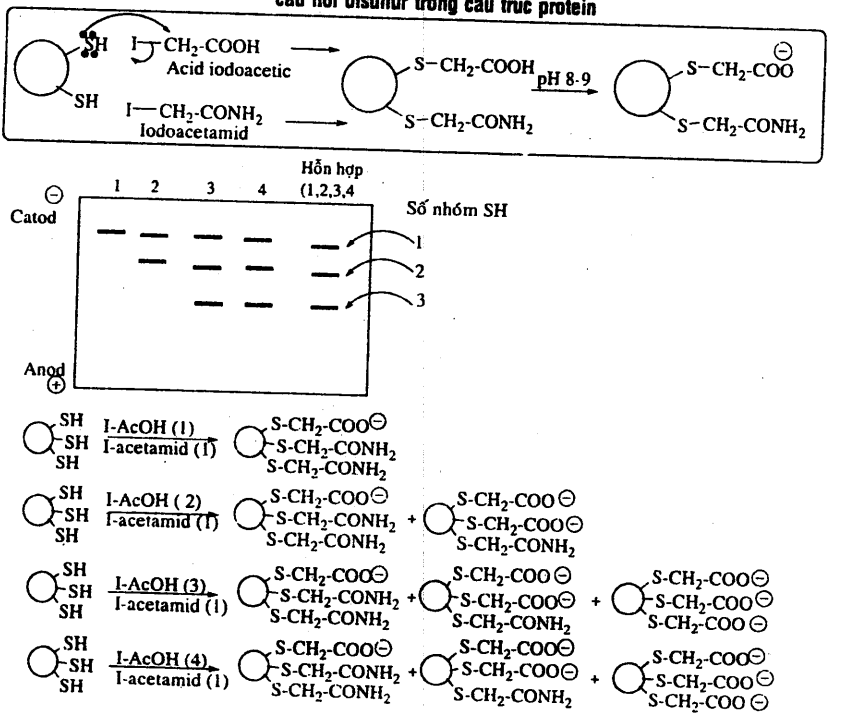
Để có thể tìm hiểu cấu trúc của protein, cần thiết phải biết số các cầu nối disulfur cũng như vị trí của các nối đó trong cấu trúc của protein.



Hình 10: Cấu trúc hoá học của phân tử insulin người, với ba cầu nối disulfur



Hình 11: SDS-PAGE phân tích protein trong điều kiện khử và không khử để biết số cầu nối disulfur trong cấu trúc protein



Hình 12: SDS-PAGE để biết số nhóm chức sulphydryl –SH hiện diện trong protein

Trước khi điện di, cần phải xử lý phân tử protein bằng cách cho protein tác dụng với một tác chất khử (reducing agent) như β-mercaptoetanol hoặc dithiothreitol. Thực hiện bằng cách cho mẫu phân tích tác dụng với dung dịch 0,1M mercaptoetanol trong dung dịch 1% SDS (w/v), phản ứng sẽ cắt đứt cầu nối disulfur biến protein thành chuỗi dây dài. Tiếp theo, thực hiện điện di, các polypeptid di chuyển tùy theo trọng lượng phân tử của nó. Phân tích so sánh trọng lượng phân tử của protein trong trường hợp có và không có sự hiện diện của tác nhân khử sẽ biết được ***số cầu nối disulfur*** trong phân tử.

Hình 11 minh hoạ phương pháp cho biết số cầu nối disulfur trong phân tử. Thí dụ một protein có trọng lượng phân tử 100 kDa; phân tử là một trimer bao gồm hai phân tử có trọng lượng phân tử 25 kDa và một polypeptid 50 kDa. Phân tử có trọng lượng phân tử ước khoảng 100 kDa. Cho protein tác dụng với một tác chất khử β-mercaptoetanol và thực hiện điện di cho biết cấu trúc của protein.

Ngoài ra, cũng cần biết số nhóm chức sulphydryl có trong protein bằng cách cho protein tác dụng với hỗn hợp gồm acid iodoacetic và iodoacetamid. Nhóm chức –SH của protein tác dụng với hỗn hợp tác chất tạo thành các chất dẫn xuất tương ứng. Trong điều kiện pH của môi trường điện di pH = 8 -9, nhóm tạo dẫn xuất với acid iodoacetic biến thành ion âm $R–S-CH_2-COO^-$ di chuyển về anod, còn nhóm tạo dẫn xuất với iodoacetamid biến thành dẫn xuất không có điện tích, không di chuyển.

Hình 12 minh hoạ phương pháp khảo sát số nhóm –SH trong một protein, thí dụ protein có mang ba nhóm –SH. Cho protein lần lượt tác dụng với bốn dung dịch của hỗn hợp acid iodoacetic: iodoacetamid có tỉ lệ lần lượt là (1: 1); (2:1); (3: 1) và (4: 1) sẽ có 4 dung dịch, mỗi dung dịch chứa hỗn hợp các protein có điện tích khác nhau. Điện di trên cùng một bản gel: 4 dung dịch và một hỗn hợp chung của 4 dung dịch đó. Đếm số dãy của hỗn hợp chung cho biết protein có bao nhiên nhóm –SH.

3. ĐIỆN DI HỘI TỤ (Isoelectric focusing, viết tắt là IEF)

Trong cấu trúc của các phân tử protein có những nhóm có điện tích, chính các nhóm này ảnh hưởng đến tính hoà tan cũng như những hoạt tính khác của protein. Điện tích toàn phần của protein chịu ảnh hưởng lớn bởi pH.

Ở môi trường acid, phần lớn các protein có điện tích dương và ngược lại, ở môi trường kiềm, phần lớn các protein có điện tích âm.

Tuy nhiên, điện tích toàn phần của từng loại protein khác nhau rất nhiều, như trình bày trong bảng 3. Sự khác nhau này phản ánh việc mỗi phân tử protein được tạo thành bởi những đơn vị amino acid khác nhau.

Ở giá trị pH mà protein không còn điện tích (điện tích toàn phần bằng zero) được gọi là điểm đẳng điện (isoelectric point, pI).

Trong những điều kiện thực nghiệm chuẩn về nhiệt độ, thành phần dung dịch đệm, cũng như không có sự hiện diện các hoá chất khác, điểm đẳng điện có thể xem như một đặc trưng xác định (một tính chất vật lý) của một protein.

Bảng 3: Giá trị điểm đẳng điện của một số protein, đo ở 10°C.

Protein	pI
Pepsin	1,00
Pepsinogen	2,80
Amyloglucosidase	3,50
Glucose oxidase	4,15
Soyabean trypsin inhibitor	4,55
Ovalbumin	4,60
Bovine serum albumin	4,90
Urease	5,00

Protein	pI
β-Lactoglobulin A	5,20
Carbonic anhydrase B	5,85
Myoglobin (dãy acid)	6,85
Myoglobin (dãy base)	7,35
Trypsinogen	9,30
Cytochrom C	10,70
Lysozym	11,00

3.1. Cấu trúc của chất điện ly lưỡng tính (ampholyte structure)

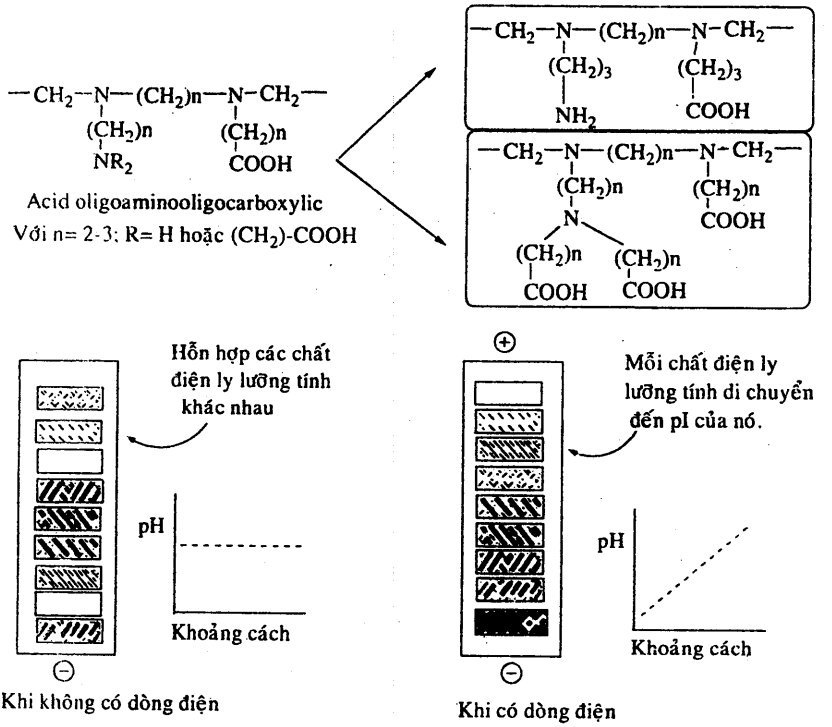
Muốn xác định pI, cần phải thiết lập một gel với gradient pH ổn định. Trong thực nghiệm, rất khó đạt được gradient nếu sử dụng các loại dung dịch đệm với các thành phần khác nhau.

Chất điện ly lưỡng tính là hợp chất tổng hợp, sản phẩm của sự polymer hoá các loại acid oligoamino oligocarboxylic có trọng lượng phân tử nhỏ. Sự phối hợp theo nhiều kiểu khác nhau cho phép điều chế được các hợp chất polymer với khoảng khác biệt rất nhỏ về pI.

Khi đặt hỗn hợp các polymer này trong một điện trường, mỗi phân tử di chuyển về hướng giá trị pI của riêng nó và dừng lại, nhờ thế tạo được gradient về pI.

Các chất điện ly lưỡng tính cũng là một loại dung dịch đệm rất tốt, nên một gradient về pH cũng được thiết lập trong vùng điện trường.

Các sản phẩm thương mại có khoảng pH rộng từ 3-9 hoặc khoảng pH hẹp từ 6-7.



Hình 13: Chất điện ly lưỡng tính là những giây polymer ngắn chứa hai loại nhóm chức $-NH_2$ và -COOH. Khi trộn các hợp chất điện ly khác nhau với nhau và không có sự hiện diện của điện trường, hỗn hợp này chỉ có một pH duy nhất. Tuy nhiên, khi có dòng điện, từng chất riêng lẻ di chuyển đến vị trí pI của nó, như thế, chúng hoạt động như dung dịch đệm và có pH gradient.

Ngoài ra, một phương pháp khác cũng cho kết quả tương đồng như trên, được gọi là gel có pH *gradient nhờ immobilin* (immobilised pH gradient). Phương pháp này sử dụng chất dẫn xuất của acrylamid, đó là immobilin, trong cấu trúc của nó có chứa các nhóm acid yếu hoặc base yếu. Các nhóm acid là acid carboxylic với pKa 3,6 hoặc 4,6; nhóm base yếu là amin tam cấp với pKa = 6,2; 7,0; 8,5; 9,3.

Để tạo bản gel gradient, ít nhất một loại immobilin acid trộn với một loại immobilin base với sự hiện diện của một monomer acrylamid để tạo thành gel polyacrylamid. Phối trộn chủng loại và số lượng của các immobilin đã có, sẽ thu được gel với pH thay đổi gradient. Trong thực nghiệm, cần chuẩn bị hai dung dịch, một dung dịch là immobilin acid hòa trong glycerol, dung dịch kia chứa immobilin kiềm. Máy trộn gel gradient tạo nên một bản gel với phần gel ở dưới đáy bản chứa nhiều immobilin acid và phần gel ở trên đầu bản chứa nhiều immobilin kiềm, khoảng giữa là gradient của sự giảm immobilin acid và sự tăng immobilin kiềm.

Bản gel loại này có ưu điểm là cho gradient với khoảng pH rất hẹp, có thể áp dụng để tìm pI của hỗn hợp các đại phân tử có giá trị pI chênh lệch nhau rất ít.

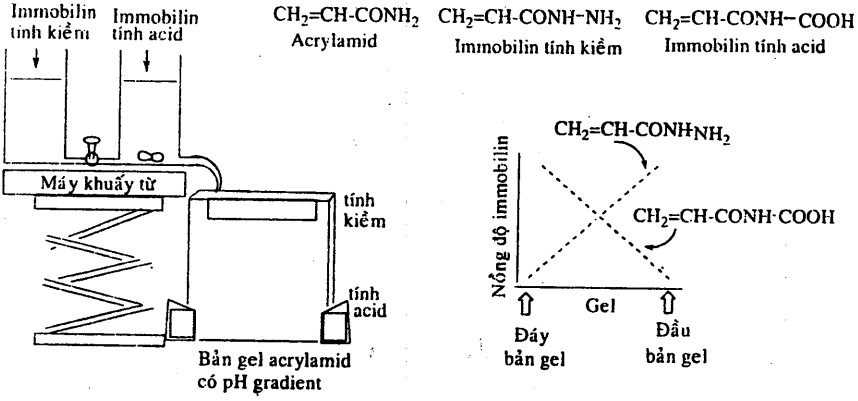
3.2. Điện di đo điểm đẳng điện (Isoelectric focusing, viết tắt là IEF)

Khi một protein được đặt vào bản gel gradient pH, protein này di chuyển về vị trí pI của nó. Nếu protein ở trong môi trường có pH cao hơn giá trị pI của nó, protein có điện tích toàn phần là điện tích âm và di chuyển về phía anod; nếu protein ở trong môi trường có pH nhỏ hơn giá trị pI của nó, protein có điện tích toàn phần là điện tích dương và nó di chuyển về phía catod; chỉ ở môi trường pH= pI, protein có điện tích toàn phần bằng zero (zero net charge) và không di chuyển trong điện trường. Vậy, khi áp dụng lên gel, chất lưỡng tính sẽ di chuyển, cho đến khi lọt vào vùng gel mà pH của môi trường gel bằng với giá trị pI của nó, nó sẽ dừng lại. Tại vị trí này, chất lưỡng tính ở dạng lưỡng cực (zwitterion) trung hòa điện tích nên ngừng lại.

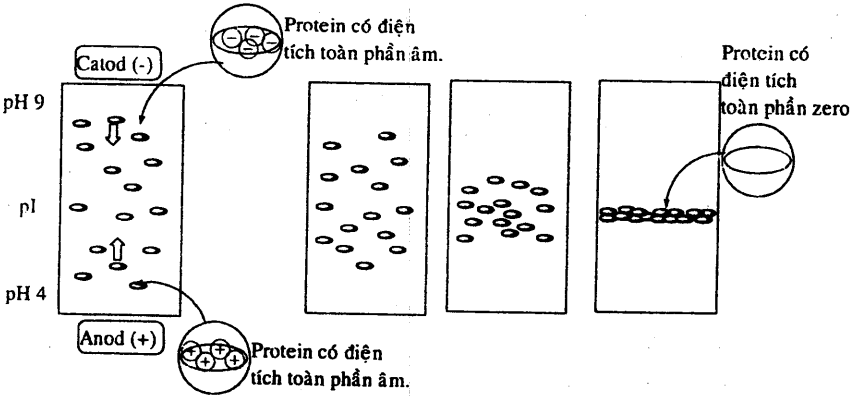
Không cần xét đến vị trí lúc bắt đầu đặt chất lưỡng tính lên trên tấm gel, chất lưỡng tính luôn luôn di chuyển đến vùng có giá trị pH của môi trường bằng với giá trị pI của nó, rồi dừng lại.

Điện di đo điểm đẳng điện có thể thực hiện trong một ống hình trụ bằng thủy tinh, được đặt thẳng đứng hoặc trên một tấm phẳng, đặt nằm ngang như minh hoạ trong hình 16.

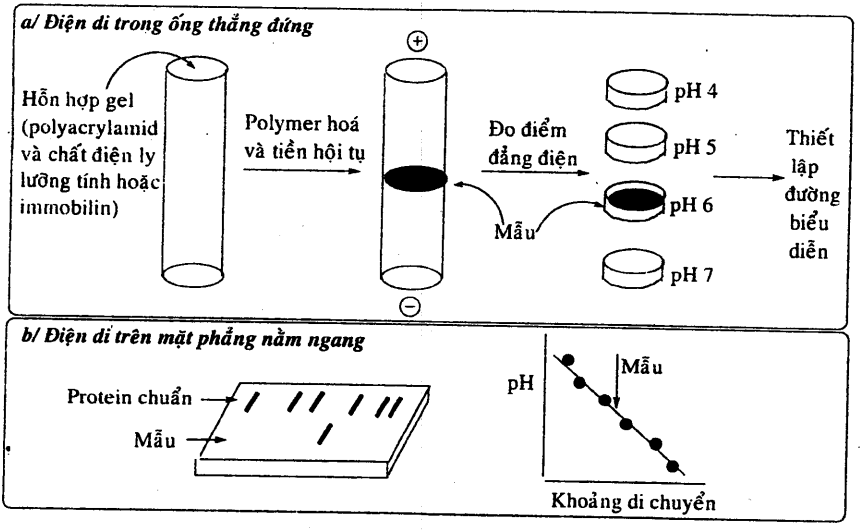
Các nhà sản xuất có bán những tấm gel có hiệu năng cao với độ sai biệt 0,01 đơn vị pH.



Hình 14: Gel có pH gradient nhờ immobilin. Hai loại chất immobilin acid và kiềm được cho vào máy chế tạo bản gel theo gradient



Hình 15: Điện di đo điểm đẳng điện. Khi một protein được đặt vào bản gel gradient pH, protein này sẽ di chuyển về vị trí pI của nó



Hình 16: Các hình thức điện di đo điểm đẳng điện

a) pH gradient được tạo thành trong những ống hình trụ, các ống này được đặt trong một điện trường. Một mẫu chất điện ly lưỡng tính được đặt trong mỗi ống trụ. Sau khi điện di, cắt ống trụ thành những khoanh mỏng và xác định pH của mỗi khoanh đó. Từ kết quả này, thiết lập đường biến thiên khoảng đường di chuyển theo pH, từ đó, tính được pI của protein

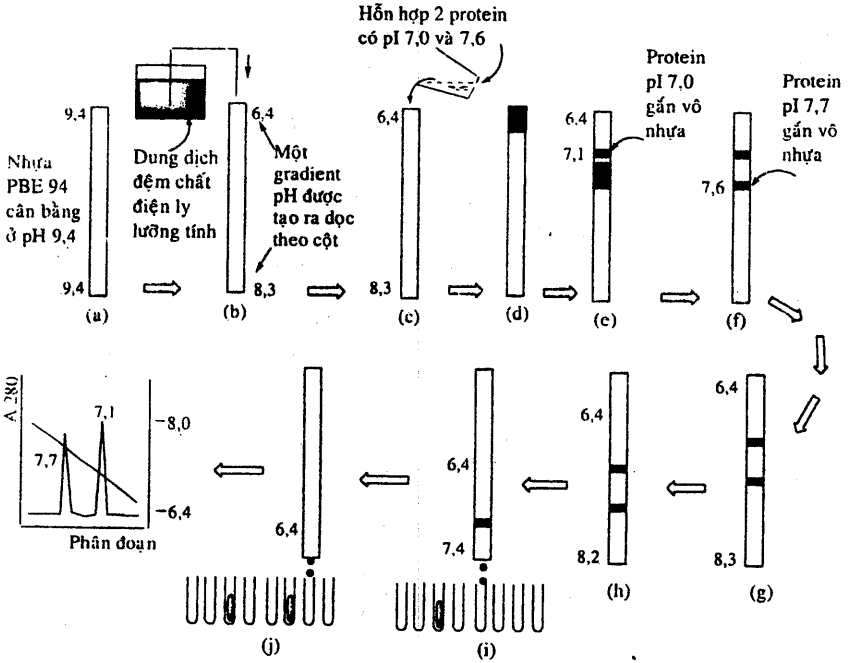
b) Điện di đo điểm đẳng điện thực hiện trên mặt phẳng nằm ngang cùng lúc mẫu phân tích và các protein chuẩn. So sánh với mẫu chuẩn, biết pI của mẫu khảo sát.

3.3. Sắc ký hội tụ (Chromatofocusing)

Nếu một nhựa trao đổi ion được cân bằng ở pH= 9 và cho tiếp xúc với một dung dịch đệm thứ nhì ở pH= 7, một gradient pH được thiết lập giữa hai dung dịch đệm này. Tuy nhiên, gradient này có khoảng pH hẹp 7,0 -9,0 và gradient này không ổn định vì dung dịch đệm như thế có *khả năng giới hạn.*

Một kỹ thuật sắc ký được gọi là sắc ký hội tụ có nguyên tắc căn bản giống như điện di đo điểm đẳng điện, sử dụng nhựa trao đổi ion ghép với những dung dịch đệm có được nhờ chất điện ly lưỡng tính, tạo nên gradient

có khoảng pH rộng và ổn định. Thực nghiệm với điều kiện này có thể tách được các protein có giá trị pI gần nhau.



Hình 17: Sắc ký hội tụ

(a): Nhựa trao đổi anion PBE 96 (Pharmacia) được cân bằng ở pH= 9,4.

(b): Một dung dịch đệm chất điện ly lưỡng tính (Polybuffer 96) được cho qua cột, hệ quả sẽ hình thành dọc theo cột một gradient pH bền với pH 6,4 -8,3.

(c): Hỗn hợp mẫu gồm hai protein có pI= 7,0 và 7,6 được đặt vào đầu cột. Lần lượt hai protein này bám vào nhựa khi nó có mang điện tích âm, lần lượt tại pH = 7,1 và 7,7.

(g): Do dung dịch đệm liên tục đi ngang qua cột, nên gradient pH di chuyển dần dần xuống đáy cột, liên tục làm cho hai protein tách rời khỏi nhựa rồi lại gắn trở vào nhựa. Cuối cùng hai protein này được giải ly ra khỏi cột ở khoảng pH có giá trị gần bằng giá trị pI của chúng.

Nhựa trao đổi ion được nhồi trong một cột sắc ký, ban đầu nhựa được cân bằng ở một pH đặc trưng (thí dụ pH = 9,4), tiếp theo đó, được cân bằng với dung dịch đệm với chất điện ly lưỡng tính (Dung dịch đệm này có khoảng pH rộng 9,0-6,0), và tự động trong cột sắc ký hình thành nên một pH gradient từ 8,3 - 6,4. Tiếp theo, nạp một hỗn hợp mẫu gồm hai protein có pI= 7,0 và 7,6 vào đầu cột. Ở đầu cột, có pH= 6,4, nên protein có điện tích toàn phần là điện tích dương, vì vậy nó không bị nhựa bắt giữ, mà tự do đi xuống phía dưới cột. Do phần cột càng xuống dưới thấp, pH càng tăng, nên khi protein theo dung dịch đệm đi xuống phía dưới cột, có lúc nó gặp khoảng cột mà pH = pI, nhưng liền ngay sau đó, môi trường pH khiến cho protein có điện tích âm làm cho protein gắn vào nhựa. Nhưng vì dung dịch đệm liên tục chảy qua cột, nên nơi mà protein gắn vào nhựa có pH từ từ nhỏ dần, đến một thời điểm protein có điện tích toàn phần dương, rời khỏi nhựa để di chuyển xuống phía dưới cột, nhưng xuống thấp thì đến vùng có pH khiến cho protein có điện tích âm, bị gắn trở lại vào nhựa một lần nữa.

Với cách thức như thế, mỗi loại protein từ từ di chuyển xuống dưới cột, liên tục được giải hấp rời khỏi nhựa, di chuyển xuống rồi bị gắn trở lại nhựa, lại được giải hấp rời khỏi nhựa... cho đến khi đi ra khỏi cột và nhờ vậy sẽ tách riêng hai protein có điểm đẳng điện khá gần nhau. Mỗi loại protein sẽ được giải hấp tách rời nhựa ở pH lớn hơn chút ít so với pI của protein.

4. ĐIỆN DI SDS–PAGE HAI CHIỀU

Một tế bào vi khuẩn đơn giản thí dụ như *E. coli* có thể có 4.000 loại protein khác nhau trong khi đó các sinh vật nhân chuẩn (eucaryote, sinh vật mà nhân có màng nhân bao bọc và nguyên sinh chất có ty lạp thể và ribosom) có thể có khoảng 50.000 loại protein khác nhau. Mỗi protein đều có cấu trúc và các đặc tính vật lý rõ ràng, xác định nên có thể được tách riêng bằng phương pháp điện di. Tuy nhiên, mặc dù điện di là một kỹ thuật với độ phân giải cao để tách rời các protein, nhưng sự tách một hỗn hợp có số lượng nhiều hơn 100 loại protein gặp nhiều khó khăn. Vì vậy, trong phần lớn các trường hợp, chỉ áp dụng điện di trên các mẫu đã được sơ chế trước đó bằng nhiều kỹ thuật khác nhau, thí dụ sắc ký... Việc kết hợp quá trình điện di đo

điểm đẳng điện với kỹ thuật SDS-PAGE góp phần tách các hợp chất đại phân tử một cách hiệu quả hơn.

4.1. Nguyên tắc căn bản của SDS-PAGE hai chiều

Trong kỹ thuật SDS-PAGE hai chiều, các protein được tách theo chiều thứ nhất bằng điện di đo điểm đẳng điện và chiều thứ nhì bằng SDS-PAGE.

Theo thông lệ, điện di đo điểm đẳng điện (IEF) được triển khai trên những miếng gel có dạng hình cái que (a rod) với sự hiện diện của urê 9M. Mẫu phân tích được đặt lên một đầu que, mỗi que chứa một mẫu khác nhau. Có thể thực hiện điện di nhiều que cùng một lúc. Các nhà sản xuất có bán sẵn các que immobilin gradient.

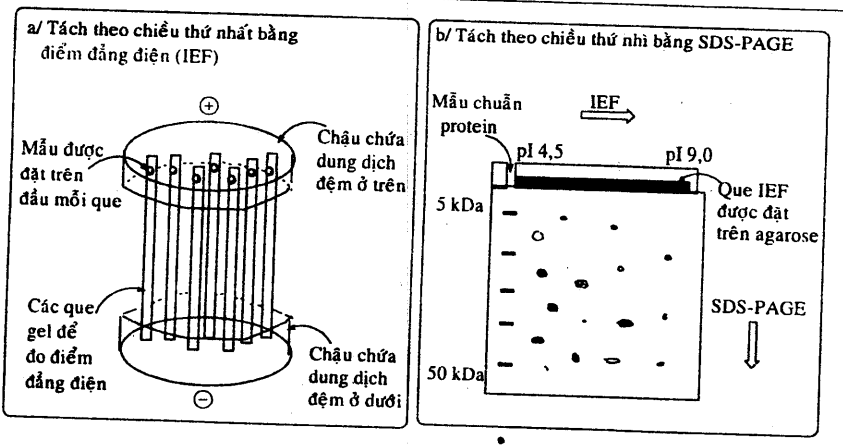
Sau khi thực hiện IEF, các que gel được thụt tuột ra khỏi ống chứa, được cân bằng với dung dịch đệm của SDS-AGE rồi đặt lên trên một tấm agarose; tiếp theo, tấm agarose này được đặt nằm ngang, phía trên đầu một gel SDS-PAGE; và điện di SDS-PAGE được thực hiện theo chiều có góc 90° so với chiều thực hiện IEF. Sau khi điện di, tấm gel được nhuộm màu để làm hiện các protein trên bản gel.

Các protein được tách theo chiều thứ nhất dựa vào sự khác biệt về giá trị điểm đẳng điện của các protein và được tách theo chiều thứ nhì dựa vào sự khác biệt về trọng lượng phân tử.

4.2. Các thiết bị sử dụng trong SDS-PAGE hai chiều (Hình 18)

Thực hiện IEF trên tấm gel đặt trong thanh que hình ống trụ làm bằng thủy tinh, đường kính ống 5 mm, chiều dài 14 cm. Mỗi máy có thể lắp được nhiều que. Các nhà sản xuất có bán sẵn các que làm bằng immobilin có pH gradient. Que gel có kích thước vừa vặn để có thể lắp vào máy đo IEF.

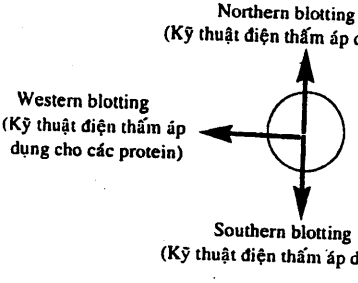
Sau khi thực hiện IEF xong, que gel được thụt tuột ra khỏi ống chứa, được đặt trên một agarose ấm và khi agarose nguội lại, que gel đã gắn dính vào tấm agarose. Tấm agarose này được đặt nằm ngang, ở phần lớp gel chuẩn bị của một tấm gel SDS-PAGE.



Hình 18: SDS-PAGE hai chiều

5. KỸ THUẬT ĐIỆN THẤM (Electroblotting procedure)

Điện di là kỹ thuật thông dụng, rẻ tiền, giúp cho việc tách riêng các hợp chất đại phân tử đạt hiệu quả cao, đôi khi cao hơn kỹ thuật phân tích bằng HPLC và MS. Một trong những tiến bộ của kỹ thuật này là việc *chuyển* các thành phần đã tách của một hỗn hợp mẫu *lên trên một màng mỏng* có tính bền cơ học để có thể tiếp tục các nghiên cứu khác, kỹ thuật này được gọi là sự thấm (blotting) và điện di là nguyên tắc căn bản để thực hiện sự chuyển đó nên kỹ thuật được gọi là sự ***điện thấm*** (Electroblotting).



Nhận xét: Các tài liệu bằng tiếng Pháp cũng sử dụng từ ngữ Northern blotting, Southern blotting... mà không dịch sang tiếng Pháp.

Đầu tiên, giáo sư Ed. Southern đã áp dụng kỹ thuật điện thấm trên các mảnh của DNA nên kỹ thuật còn được gọi là ***Southern blotting***. Tên gọi *Southern* gợi lên các hướng khác nhau theo phương hướng của la bàn khiến cho các nhà khoa học có ý tưởng vui đặt tên cho việc áp dụng kỹ thuật điện

thấm trên protein là Western blotting và trên RNA là Northern blotting để nói lên rằng các kỹ thuật này có cùng nguồn gốc.

5.1. Thiết bị sử dụng trong kỹ thuật điện thấm

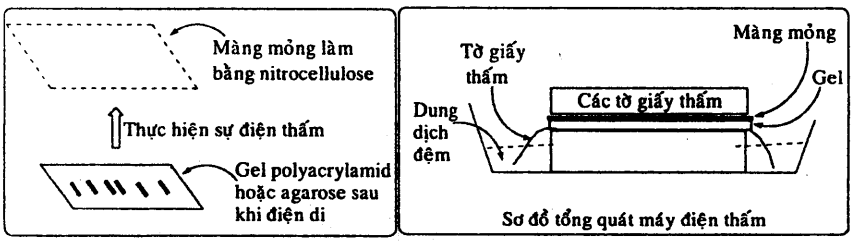
Thiết bị điện thấm gồm một hộp có gắn sẵn hai điện cực âm và dương. Sau khi điện di, tấm gel polyacrylamid được lấy ra khỏi máy điện di và đặt nằm trên một miếng màng mỏng. Kẹp hai miếng này giữa hai tấm điện cực phẳng, giống như một "miếng sandwich". Miếng sandwich này được ngâm chìm hoàn toàn trong dung dịch đệm. Áp dụng một điện trường thẳng góc với mặt phẳng của tấm gel, các thành phần khác nhau trên tấm gel sẽ thấm gắn *một cách không thuận nghịch* lên màng mỏng nitrocellulose nhờ vào sự tương tác kỵ nước (hydrophobic interaction).

Có một hệ thống làm hao tốn dung dịch đệm ít hơn được gọi là hệ thống bán-khô (semi-dry system), trong đó dung dịch đệm được cho thấm đẫm trong những tờ giấy thấm và các tờ giấy thấm cho bọc phủ lên hai bên mặt của miếng sandwich tạo thành một miếng sandwich dầy hơn.

Tấm màng mỏng thường được làm bằng nitrocellulose, tuy nhiên, nếu sau đó cần muốn nghiên cứu với một kỹ thuật khác nữa, thí dụ, muốn thực hiện sự giảm cấp Edman trên đầu *N* của chuỗi dây peptid, có thể sử dụng màng mỏng có tính dai chắc hơn làm bằng polyvinylidendifluorid (PVDF).

5.2. Các ứng dụng của kỹ thuật điện thấm

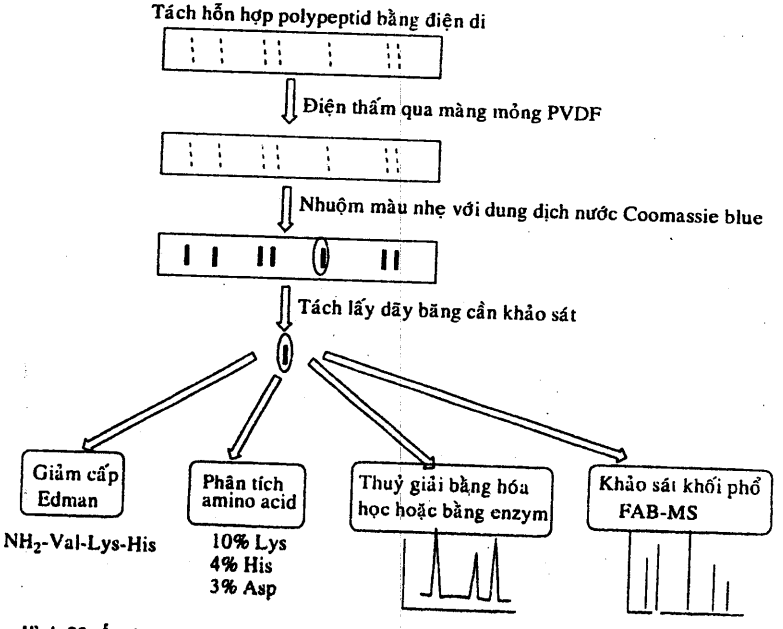
Kỹ thuật điện thấm được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu các protein, RNA, DNA... với các tên gọi như Western blotting, Northern blotting... được trình bày trong các phần sau



Hình 19: Nguyên tắc căn bản của sự điện thấm

Ứng dụng kỹ thuật điện thấm để nghiên cứu các polypeptid

Phần lớn trường hợp sử dụng điện di như một phương pháp định tính, giúp tách một hỗn hợp thành các thành phần riêng biệt để có thể định lượng từng cấu phần có trong hỗn hợp. Tuy nhiên, do kỹ thuật điện di có khả năng tách các cấu phần trong hỗn hợp với hiệu quả tách cao, nên có thể sử dụng kỹ thuật này để cô lập các hợp chất đại phân tử để có thể tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về cấu trúc của peptid.



Hình 20: Áp dụng điện thấm để thu nhận các polypeptid cho các nghiên cứu tiếp theo

6. ĐIỆN DI MIỄN DỊCH (Immunoelectrophoresis)

(Đọc thêm một số kiến thức cơ bản về sinh học ở chương phụ lục)

Kháng thể (antibody) là những protein có liên quan đến việc nhận biết được các chất miễn dịch, thường gọi là kháng nguyên (antigen). Các kháng nguyên có thể là những hợp chất có trọng lượng phân tử nhỏ, thí dụ như các phân tử đường, hoặc là những hợp chất polymer sinh học với cấu trúc phức tạp thí dụ các protein.

Tính chất có thể nhận diện được các đặc điểm sinh học đã khiến cho các kháng thể, đặc biệt là các hợp chất ***immunoglobulin*** thuộc loại G (The G class, viết tắt là IgGs) rất hữu dụng để làm một máy dò phân tử (molecular probe) để nhận diện được cấu trúc của các protein, các đại phân tử có cấu trúc phức tạp, các con virut (virus).

Nguồn kháng thể chủ yếu thu nhận từ các con thỏ (khi thỏ được tiêm chích kháng nguyên, nó cho đáp ứng bằng sự gia tăng trong huyết tương của nó các kháng thể polyclonal) hoặc từ tế bào thể lai của con chuột (cho đáp ứng bằng sự gia tăng các kháng thể monoclonal trong môi trường nuôi cấy tế bào).

Trong thực nghiệm, khi tách một hỗn hợp đại phân tử bằng phương pháp điện di, người ta luôn mong muốn nhận diện từng loại protein trong hỗn hợp. Các kháng thể cho thấy sự ích lợi trong loại thực nghiệm trên.

Kỹ thuật sử dụng điện di để nhận diện các chất miễn dịch được gọi là kỹ thuật điện di miễn dịch. Kỹ thuật sử dụng loại gel có lỗ rỗng tương đối lớn hơn nhiều so với kích thước của phân tử chất kháng thể và kháng nguyên Sử dụng gel agarose cho các protein, và sử dụng polyacrylamid với phân tử có trọng lượng phân tử nhỏ như peptid.

Các loại gel nêu trên là loại gel không giới hạn (non-restrictive) bởi vì mục đích của loại gel này là tách riêng các hợp chất chỉ dựa vào sự khác nhau về điện tích của chúng, mà không phải vì sự khác nhau về khối lượng hoặc hình dạng bên ngoài. Kỹ thuật này giúp tách rất nhanh trong vòng một giờ đồng hồ so với tách bằng kỹ thuật miễn dịch cần phải vài ngày.

6.1. Kỹ thuật Dot-blotting (xem thêm phần 5.1 ở chương phụ lục)

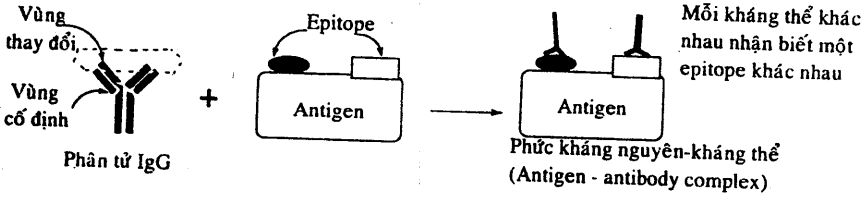
Trước khi thực hiện kỹ thuật điện di miễn dịch, cần biết chắc rằng các kháng thể hiện diện trong mẫu thử phải có tính đặc hiệu (có ái lực mạnh) với các kháng nguyên cần quan tâm.

Trong kỹ thuật này, cần trải qua hai thực nghiệm không sử dụng điện di (two non-electrophoretic experiments) trong đó antigen (kháng nguyên) và antibody (kháng thể) được ghép lại với nhau, như thế mới có thể được nhận diện và định lượng.

Rất cần thiết phát hiện sự hiện diện và nồng độ của antibody bởi vì giữa các antigen khác nhau, có sự thay đổi rất lớn trong tính miễn dịch: một vài antigen cho đáp ứng rất mạnh với từng loại động vật thử nghiệm và không cho đáp ứng với loại khác.

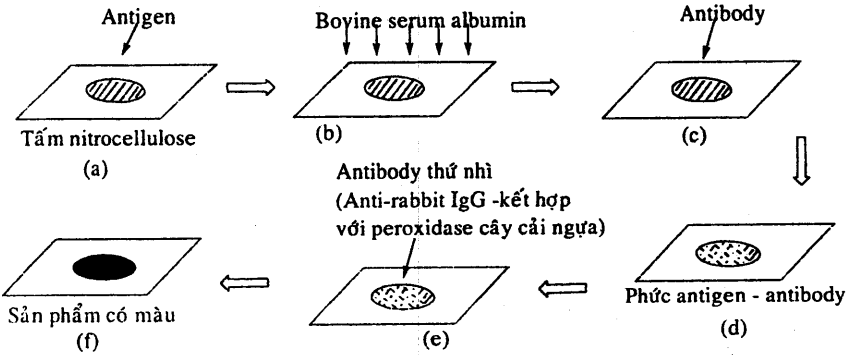
Khi một protein và một kháng thể gặp nhau, sẽ có một tương tác đặc trưng xảy ra giữa ***vùng biến đổi*** (variable region) của kháng thể ***với epitope*** của kháng nguyên (epitope là một vùng đặc biệt ở trên kháng nguyên). Với loại kháng thể đa dòng (polyclonal antibody) có thể có một số epitope hiện diện trên bề mặt của chỉ một antigen. Với loại kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody), có một epitope hiện diện trên bề mặt của một antigen.

Nếu sử dụng lượng thừa của hoặc kháng thể hoặc kháng nguyên, sau khi nhuộm màu phức tạo thành giữa kháng thể-kháng nguyên, phức này có thể được sử dụng để đo nồng độ của hoặc kháng thể hoặc kháng nguyên.



Hình 21: Sự kết dính của kháng thể vào kháng nguyên

Vùng biến đổi của kháng thể gắn dính vào một vùng đặc trưng của kháng nguyên, vùng này được gọi là epitope. Các epitope khác nhau trong những cấu trúc của protein có thể được nhận diện bởi các kháng thể đặc trưng. Kháng thể đa dòng có thể nhận diện được nhiều epitope trong cùng một kháng nguyên, trong khi các kháng thể đơn dòng chỉ có thể nhận ra một.



Hình 22: Một thử nghiệm Dot blot

(a): Kháng nguyên được cho gắn lên màng nitrocellulose.

(b): Bovine serum albumin được cho vào để làm bão hòa các vị trí không thể tạo sự gắn dính đặc trưng.

(c): Kháng thể được cho vào.

(d): Phức kháng thể-kháng nguyên.

(e): Kháng thể thứ nhì được cho vào, sẽ gắn vào vùng cố định của phân tử IgG; và kháng thể này trước đó đã được cho gắn dính vào peroxidase cây cải ngựa.

(f): Sản phẩm có màu.

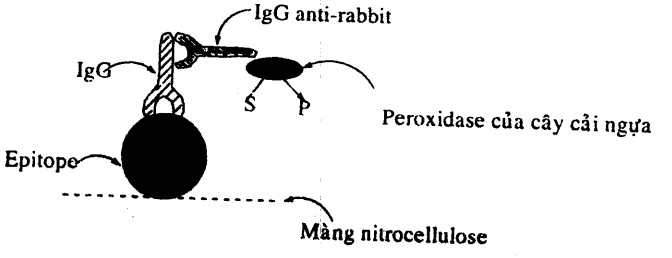
Trong kỹ thuật Dot-blotting, kháng thể, sau khi được tách rời bằng điện di, được tiếp tục thực hiện sự chuyển điện di (electrotransfer) để chuyển các protein trong các dãy trên bản gel sang một tấm nitrocellulose. Các vị trí có thể kết dính khác ở trên bản gel được bão hòa bằng những "protein-không có antigen" (non-antigen protein) thí dụ như bovine serum albumin. Tiếp theo, cho thêm vào một dung dịch kháng thể để tạo sự kết dính đặc trưng của kháng thể vào kháng nguyên, được gọi là phức kháng nguyên –kháng thể. Phức này có thể định lượng bằng cách cho nó kết dính với một kháng thể thứ nhì. Kháng thể thứ nhì này phải có hai đặc điểm:

i) có thể nhận diện *vùng thay đổi* của phân tử IgG, thí dụ đó là IgG anti-goat hoặc IgG anti-rabbit,

ii) được gắn dính bằng một nối hóa trị vào một enzym, thí dụ peroxidase của cây cải ngựa (horseradish peroxidase) để có thể giúp cho việc định lượng sau này.

Mỗi phân tử kháng thể gắn vào một phân tử kháng nguyên. Kháng thể thứ nhì, đến lượt nó, gắn dính vào IgG này. Vì mỗi kháng thể thứ nhì có gắn một enzym, nên enzym này xúc tác làm cho hằng ngàn phân tử chất nền biến thành sản phẩm có màu. Qua đó, việc nhuộm màu được khuếch đại để dễ dàng quan sát so với việc nếu một protein màu nhuộm một phức.

Thường thực nghiệm được thực hiện bằng một loạt dung dịch kháng thể pha loãng ở các nồng độ khác nhau, nhờ thế, biết được nồng độ của kháng thể trong huyết tương của động vật muốn thử nghiệm.



6.2. Western blotting

Với các protein, sau khi sử dụng phương pháp điện di SDS-PAGE để tách một hỗn hợp protein thành các thành phần khác nhau, các thành phần đó có thể được chuyển qua màng nitrocellulose bằng kỹ thuật điện thấm. Tiếp theo, rửa màng mỏng với một dung dịch protein gọi là "dung dịch khoá" (blocking solution) để khoá tất cả các vị trí không đặc trưng trên kháng thể. Dung dịch này thường là bovine serum albumin, viết tắt là BSA; cũng có thể sử dụng loại protein khác.

Tiếp theo, rửa màng mỏng nitrocellulose với một dung dịch kháng thể có ái lực đặc biệt với một hoặc nhiều protein (các protein này vừa được tách rời nhờ điện di SDS-PAGE). Kháng thể này có thể là IgG thỏ (IgG rabbit), gắn đặc trưng vào protein trên bề mặt của màng mỏng. Kháng thể gắn vào epitope của protein. Kháng thể này sẽ được phát hiện nhờ sử dụng một kháng

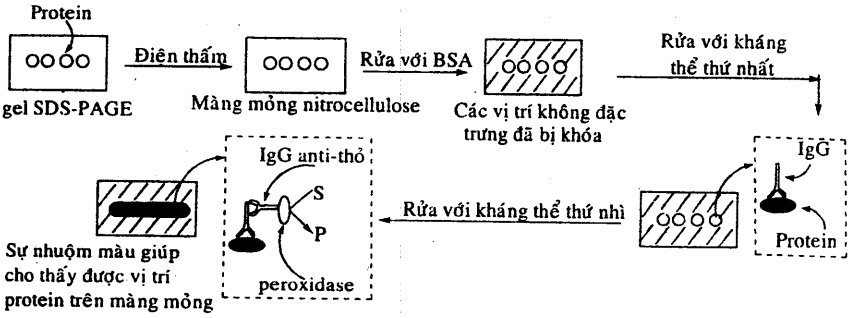
thể thứ nhì bằng cách rửa màng mỏng bằng một dung dịch kháng thể thứ nhì, loại có ái lực đặc trưng với kháng thể thứ nhất, thí dụ IgG kháng- thỏ (anti-rabbit IgG). Kháng thể này là loại sản phẩm thương mại và có ưu điểm là phù hợp cho tất cả các loại kháng thể.

Kháng thể thứ nhì này trước đó đã gắn vào một enzym thí dụ như peroxidase của cây cải ngựa. Nhờ peroxidase, có thể nhìn thấy vị trí của protein này ở trên màng mỏng bằng cách rửa màng mỏng một lần nữa với một hợp chất nào đó có thể kết hợp với enzyme peroxidase để thành sản phẩm có màu.

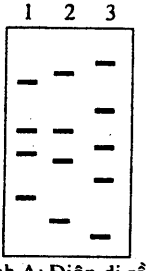
Do làm hiện màu nhờ vào các kháng thể, kỹ thuật này cũng thường được áp dụng để làm sáng tỏ thêm mối liên quan về cấu trúc giữa các protein.

Trong kỹ thuật Western blotting, các protein không cần thiết phải tinh sạch lắm, có thể áp dụng trên hỗn hợp còn thô tạp như huyết tương, dịch chiết màng tế bào...

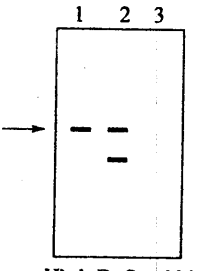
Về hiệu năng của sự điện thấm: các protein có trọng lượng phân tử nhỏ, có tính dễ hòa tan sẽ dễ dàng được điện thấm hơn là các loại protein hình sợi và có trọng lượng phân tử lớn. Sự điện thấm từ bản gel qua màng mỏng nitrocellulose chỉ ngang qua một khoảng cách gần nên quá trình thực hiện hoàn tất trong khoảng một giờ đồng hồ. Trong trường hợp khó thể thực hiện được, không nên kéo dài thêm thời gian mà cần phải tìm cách thay đổi điều kiện điện chuyển thí dụ như: nồng độ SDS, có hoặc không có sự hiện diện của metanol, lực ion của dung dịch đệm sử dụng và cường độ dòng điện (mA/cm^2).



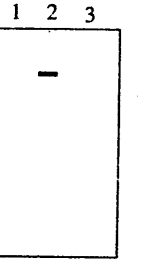
Hình 23: Western blotting



Hình A: Điện di rồi nhuộm màu bản gel bằng Coomassie blue



Hình B: Sau khi điện di,thực hiện Western blotting với các loại kháng thể cần thiết



Hình C: Sau khi điện di, thực hiện Western blotting với các loại kháng thể khác với loại đã sử dụng trong hình B

Hình 24: Điện di SDS-PAGE thực hiện riêng biệt trên ba bản gel polyacrylamid. Dãy 1 và 2: Hai mẫu hợp chất khác nhau cần xác định. Dãy 3: Hỗn hợp các protein với cấu trúc và trọng lượng phân tử đã được biết rõ.

Hình A: Bản gel được nhuộm màu bằng Coomassie blue, tất cả các dãy protein đều hiện ra trên bản.

Hình B: Một protein có tính chất miễn dịch giống nhau được tìm thấy trong cả hai mẫu thử (mũi tên trong hình). Trong mẫu số 2, còn có thêm một protein miễn dịch thứ nhì. Protein miễn dịch thứ nhì này có thể là một mảnh bị cắt đứt từ protein miễn dịch thứ nhất.

Hình C: Một protein miễn dịch khác nữa cũng được tìm thấy trong mẫu số 2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] **B.D. Hames, D. Rickwood**. *Electrophoresis of proteins*. IRL Press. 1981

[2]. **David Sheehan**. *Physical biochemistry. Principles and applications*. John Wiley and Sons, LTD. New York. Toronto. 2000.

[3]. **ED. T.S. Klork, R.H. Burdon**. *Laboratory technique in biochemistry and molecular biology*. Biomedical Press. Paris, 1983.

[4]. **Jacqueline Etienne, Eric Clauser**. *Biochimie genetique. Biologie moleculaire*. Masson. Paris. 2001.

[5]. **John Kenkel**. *Analytical chemistry for technicians*. CRC Press LLC. Florida. 2003.

PHỤ LỤC

1. CÁC CHẤT LÀM KHÔ VÀ MỘT VÀI DỤNG CỤ TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

Trong phòng thí nghiệm thường sử dụng một số chất làm khô như trình bày trong bảng 1.

Bảng 1: Các chất làm khô và một số tính chất của nó.

Tên	Trường hợp sử dụng để làm khô	Tính chất hóa học	(a)	(b)	(c)
Sulfat natri	Chất lỏng. Không phù hợp cho metanol, etanol, propanol	Trung tính	y	12	30
Clorur natri	Chất rắn, lỏng, khí. Không phù hợp cho alcol, phenol, amin	Acid yếu	y	12	29
Clorur calci	Chất rắn, lỏng, khí. Chỉ phù hợp cho hydrocarbon, dẫn xuất halogen	Trung tính	m	-	-
Sulfat calci	Chất rắn, lỏng	Trung tính	tb	1,5	100
Sulfat magne	Chất lỏng. Không phù hợp cho metanol, etanol, propanol	Trung tính	y	5	100
Acid sulfuric	Chất rắn, khí. Không phù hợp cho chất có tính base	Acid	tb	3	100
NaOH (KOH)	Chất rắn, lỏng, khí. Không phù hợp cho ester, acid carboxylic, chất có halogen	Base	y	8	30
P_2O_5	Chất rắn, lỏng. Không phù hợp cho alcol, ester, amin, aldehyd, ceton	Acid	m	1,5	30
Oxyd calci	Chất lỏng, khí. Không phù hợp cho phenol, acid carboxylic, ester	Base	m	3	100
Alumin	Chất lỏng. Không phù hợp cho hợp chất rất phân cực và dễ bị oxid hóa	Acid, base, trung tính	tb	*	100
Silica gel	Chất lỏng, khí.	Trung tính	tb	4	25
Rây phân tử	Chất lỏng, khí.	Trung tính	tb	*	100

Ghi chú: (a): Hoạt tính hút ẩm: y: yếu; m: mạnh; tb: trung bình

(b): Khả năng giữ được ***khoảng*** X gam nước so trên 10 g chất làm khan.

(c): Hoạt tính đến nhiệt độ (°C)

(*): tuỳ theo loại

Các giải thích bổ sung

a) **Acid sulfuric** (Sicacid): Khi cần làm khô một chất rắn đặt trong bình hút ẩm, có thể sử dụng acid sulfuric đậm đặc, nhưng như thế rất nguy hiểm, không được di chuyển bình hút ẩm trong quá trình làm khan. Hiện nay, người ta thường sử dụng sicacid (Đó là những hạt rắn). Người ta cho 25% chất hấp thu, sử dụng như chất mang rắn, vào acid sulfuric. Sử dụng các hạt này có thuận tiện là màu của hạt cho biết độ hút ẩm của hạt đã đạt đến mức độ nào. Nếu có màu đỏ-tím, hạt khô ráo; nếu hạt chuyển qua vàng-xanh dương, hạt đã hút ẩm 40%.

b) **Các hạt NaOH rắn** (hoặc KOH rắn): Hút ẩm và các khí có tính acid. Rất nguy hiểm.

c) **Silica gel** (Gel xanh dương): Là silica gel có trộn thêm chất chỉ thị màu là clorur cobalt (II) để biết hàm lượng ẩm. Hạt gel khô có màu xanh dương, hạt gel hút ẩm có màu hồng. Có thể tái sử dụng bằng cách sấy trong tủ sấy ở 110°C.

d) **Rây phân tử** (Tamis molecular): là zeolit tổng hợp; là các tinh thể aluminosilicat khan với công thức thí dụ Zeolit A là $Na_{12}[(AlO_2)_2(SiO_2)_{12}]$. 27 H_2O. Sản phẩm thương mại ở dạng hạt hình cầu hoặc hình trụ dài khoảng 3mm, đường kính khoảng 1mm.

Trong tinh thể của zeolit, có nhiều ống rãnh thông từ bên trong ra bên ngoài; các đường ống này có đường kính xác định đối với mỗi loại zeolit. Có nhiều loại rây phân tử với đường ống với đường kính cỡ lỗ thay đổi trong khoảng 0,3 đến 10 nm. Để hút ẩm các loại dung môi hữu cơ, sử dụng hạt zeolit có đường ống với đường kính lỗ 0,30–0,40 nm.

Zeolit A có ống với đường kính 0,40 nm. Zeolit X ống với đường kính 0,74 nm (tức 7,4 anstrong).

* *Ưu điểm của rây phân tử*: Nếu bảng 1 cho thấy có nhiều loại chất làm khan không phù hợp để hút ẩm các alcol dây ngắn như etanol, rây phân tử có thể sử dụng cho trường hợp đó. Kích thước của các phân tử etanol là 0,44 nm, của phân tử nước là 0,33. Loại rây phân tử với kích cỡ lỗ rỗng 0,40nm cho các phân tử nước chui vào trong tinh thể trong khi đó các phân tử etanol vẫn nằm bên ngoài.

Các loại rây phân tử có thể hữu dụng với từng loại chất với kích thước phân tử xác định. Thí dụ kích thước của các phân tử H_2 là 0,24 nm; của khí carbonic (0,28nm); amoniac (0,36nm); cyclohexan (0,61nm) và cloroform (0,69nm).

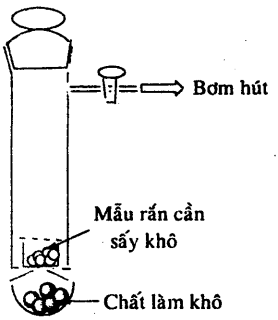
Giữa hai loại phân tử có cùng kích thước, rây phân tử hấp thu nhiều đối với phân tử nào có tính phân cực mạnh hơn.

Rây phân tử rất hữu dụng để làm khan các dung môi hữu cơ có tính phân cực mạnh.

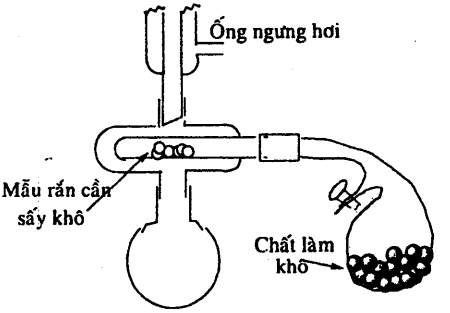
* *Cách làm khan dung môi bằng rây phân tử*: Cho các hạt rây phân tử vào chai đang có chứa dung môi, lắc chai trong vài phút rồi lọc lấy dung môi khan. Hoặc cho dung môi chảy chầm chậm ngang qua một cột (giống cột sắc ký).

* *Tái sử dụng rây phân tử*: Có thể tái tạo rây phân tử nhiều lần, hầu như vô hạn, mà không sợ mất hoạt tính. Trước khi tái tạo, khuấy các hạt rây phân tử trong một lượng lớn nước cất để nhã ra hết các tạp bẩn cũng như loại bỏ hết các dung môi hữu cơ dễ cháy mà nó đã ngậm trước đó. Lọc, để ráo, sấy vài giờ 300°C trong tủ sấy. Các phân tử nước còn sót lại (3-5%) được loại bỏ khi sấy tiếp theo trong 15 giờ ở 180°C ở áp suất thấp.

Rây phân tử vừa được tái tạo hấp thu ẩm rất nhanh, nên cần phải trữ nó trong chai đậy kín và giữ chai ở nơi khô ráo. Rây phân tử thương mại vẫn còn chứa 1-2% nước nhưng không ảnh hưởng gì đến quá trình hút ẩm của nó.



Dụng cụ sấy mẫu. Có thể tự chế với nguyên tắc giống như bình hút ẩm



Súng sấy mẫu BRAHM và WETZEL nóng lên nhờ việc đun hoàn lưu một chất lỏng. Mẫu cần sấy được đặt trong ống nằm ngang và chất làm khô đặt trong bình nằm ngang. Hiện nay có súng sấy bằng điện, gọn hơn.

Hình 1: Một vài dụng cụ sấy mẫu ở lượng nhỏ

2. LỖ RỖNG CỦA PHỄU LỌC XỐP

Các phễu lọc xốp được sản xuất với nhiều kích cỡ thể tích khác nhau (giống chuẩn như bình cầu, becher..)với các loại thể tích: 5; 10; 50; 100; 250; 500; 1000 ml. Để thuận tiện lựa chọn, trên phễu được khắc các chỉ số cho biết phễu được làm bằng loại thủy tinh gì và có cỡ lỗ xốp bao nhiêu.

Mỗi nhà sản xuất có các cỡ không đồng nhất nhau. Theo tiêu chuẩn ISO phân biệt 9 cỡ lỗ xốp trong phễu (bảng 2).

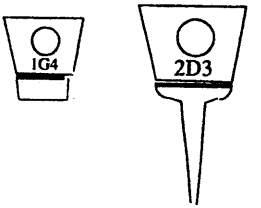
* Các chữ để chỉ loại thủy tinh dùng để chế tạo phễu: D: thủy tinh Duran 50; R: thủy tinh Rasotherm; G: thủy tinh Jena: P: thủy tinh Pyrex.

* Các số để chỉ cỡ lỗ xốp. Bảng 2 trình bày các loại phễu với các số, chữ, chỉ rõ tính năng của phễu.

Thí dụ : 1G 4 (hoặc 1G POR 16)

1 : Kích thước phễu
G : Loại thủy tinh
4 : Kích cỡ của lỗ xốp

Hai dạng phễu lọc xốp: có đuôi và không có đuôi



Nhắc lại, trong bài sắc ký nhanh-cột khô, phễu lọc xốp đóng vai trò như cột sắc ký để chứa pha tĩnh, ở đây để chứa các hạt silica gel có đường kính hạt trung bình khoảng 40-200 µm. Vì thế sử dụng phễu có cỡ 2 hoặc 3 là vừa, vì như thế dung môi chảy dễ dàng. Sử dụng cỡ lỗ quá nhỏ sẽ gây khó khăn cho dòng chảy của dung môi.

Bảng 2: Các cỡ lỗ xốp của phễu lọc

Lỗ xốp theo tiêu chuẩn ISO		Đường kính trung bình của lỗ (µm)	Trường hợp sử dụng phễu lọc xốp
00	-	251 – 500	Lọc đặc biệt, khi cần cỡ lỗ lớn
0	POR 250	160 – 250	Lọc thô thường lệ, dung môi chảy qua tự do
1	POR 160	101 – 160	Giữ hạt hơi to, dung môi chảy qua tự do
2	POR 100	41 – 100	Giữ các hạt trung bình, dung môi chảy qua dễ dàng
3	POR 40	17 – 40	Lọc giữ các hạt nhuyễn mịn, dung môi chảy qua chậm
4	POR 16	11 – 16	Lọc giữ các hạt rất nhuyễn mịn, cần máy bơm hút loại thường hỗ trợ
5	POR 10	4 – 10	Lọc giữ các hạt cực mịn, cần máy bơm hút loại thường hỗ trợ
6	POR 4	1,6 – 4	Lọc giữ các hạt cực mịn, cần máy bơm hút mạnh hỗ trợ
7	POR 1,6	< 1,6	Lọc giữ các loại có kích cỡ vi khuẩn, cần máy bơm hút mạnh hỗ trợ

3. SỰ KHÚC XẠ CỦA ÁNH SÁNG

Sự khúc xạ của ánh sáng là hiện tượng xảy ra đối với tất cả các vật chất trong suốt. Sự khúc xạ là sự thay đổi vận tốc và phương truyền của ánh sáng khi ánh sáng đi từ một vùng này qua một vùng khác.

Chỉ số khúc xạ (n) của một môi trường nào đó, là tỉ lệ của vận tốc ánh sáng đi trong chân không so với vận tốc ánh sáng đi ngang qua môi trường đó.

Môi trường càng chiết quang, vận tốc ánh sáng càng giảm, chỉ số khúc xạ càng lớn.

Chỉ số khúc xạ không có đơn vị.

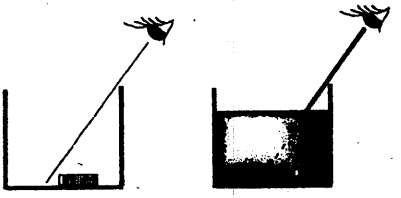
Chỉ số khúc xạ của nước là:

$$n = \frac{300.000\ km/s}{225.000\ km/s} = 1,333$$

Các thí dụ sau đây minh họa về hiện tượng khúc xạ.

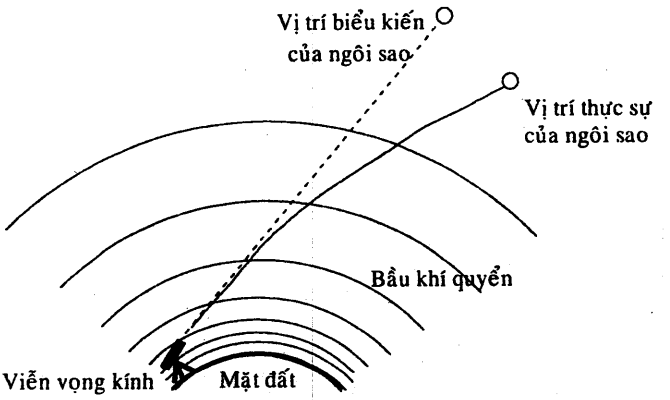
Thí dụ 1: Quan sát đồng xu ở đáy chậu khi chậu không và khi chậu có chứa nước.

Khi nhìn xuống đáy chậu trống, đồng xu ở vị trí khuất nên mắt quan sát viên không nhìn thấy



Khi chậu được đổ đầy nước, vị trí biểu kiến của đồng xu thay đổi nên mắt quan sát viên nhìn thấy được. Vậy, con mắt nhìn thấy vị trí biểu kiến của đồng xu, chứ không phải vị trí thật sự của đồng xu

Thí dụ 2: Trên bầu trời ban đêm, người ta thấy các ngôi sao tại vị trí biểu kiến của nó chứ không phải vị trí thật sự của nó, vì ánh sáng của ngôi sao đã bị khúc xạ khi đi xuyên qua tầng khí quyển.

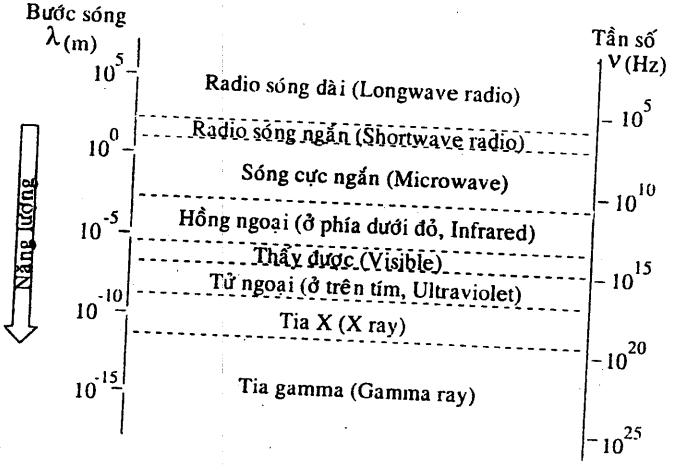


4. PHỔ ĐIỆN TỪ (Electromagnetic spectrum)

Phục vụ kiến thức cho phần đầu dò (detector) trong các máy GC và HPLC.

Con mắt của người có thể nhìn thấy phổ điện từ trong một phần tương đối nhỏ của phổ. Trong khi đó, một số loài côn trùng có thể nhìn thấy một phần khác của phổ điện từ mà mắt người không thể thấy, do protein của bộ phận thu nhận của con mắt chúng, thí dụ loài ong, có thể phát hiện những bước sóng khác nhau chỉ cách biệt nhau một khoảng cách rất nhỏ để có thể nhận những loại hoa thích hợp cho chúng.

Phổ điện từ



Các loại bức xạ mà mắt thường không nhìn thấy được, có nhiều ứng dụng là: tia hồng ngoại (infrared, dưới đỏ), tử ngoại (ultraviolet, trên tím, cực tím), vi ba (sóng cực ngắn, microwave), sóng radio (radiowave) và tia X (X-ray). Nguồn gốc căn bản của sự tương tác giữa vật chất với mỗi loại sóng điện từ có sự khác nhau, nên nếu muốn khảo sát các loại sóng điện từ khác nhau, cần phải có các trang thiết bị đặc thù. Tuy nhiên, tất cả chúng đều là một phần của phổ điện từ, chúng khác nhau ở bước sóng, tần số và năng lượng.

4.1 Phổ điện từ

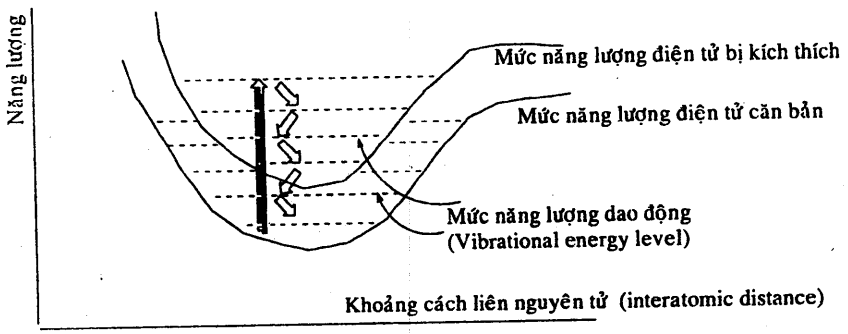
4.1.1. Phổ hấp thu tử ngoại. thấy được (Ultraviolet.visible absorption spectroscopy)

Người ta nhìn thấy ánh sáng mặt trời màu trắng, nhưng khi tia sáng này va chạm vào một vật thể có màu, một phần của ánh sáng này bị hấp thu và phần ánh sáng không bị hấp thu sẽ còn lại và phản chiếu và mắt thường nhận thấy được cho người ta thấy vật thể có màu.

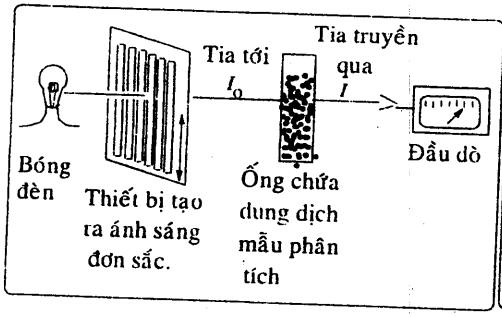
Nếu ánh sáng, trong phần UV.Vis của phổ điện từ, được cho đi ngang một dung dịch có chứa mẫu chất cần phân tích, một số năng lượng của ánh sáng có thể bị hấp thu.

Các phân tử hoặc một phần của phân tử có khả năng hấp thu ánh sáng như thế được gọi là nhóm mang màu (chromophore), và tính chất này được áp dụng trong thực nghiệm về quang phổ hấp thu. Tại những tần số đặc thù mà ánh sáng bị hấp thu, các tần số này chịu ảnh hưởng gây ra bởi cấu trúc cũng như các yếu tố chung quanh của nhóm hàm sắc đó.

Năng lượng ánh sáng được sử dụng để gây ra sự dịch chuyển của điện tử từ mức năng lượng căn bản lên mức năng lượng kích thích được biểu diễn bằng giản đồ Morse. Do có cấu trúc hóa học khác nhau, mỗi loại cấu trúc hoá học hấp thu ánh sáng ở những tần số khác nhau chút ít.



Hình 2: Nguyên tắc vật lý căn bản về sự hấp thu



Định luật Beer-Lambert

Sự hấp thu $A_{(\lambda)} = \log\frac{I_0}{I} = \varepsilon . c . l$

A : Độ hấp thu ở một bước sóng cụ thể

I_0 : Cường độ ánh sáng tới

I : Cường độ ánh sáng truyền qua

c : Nồng độ mol

ε : Hệ số hấp thu

Hình 3: Nguyên tắc căn bản của phổ quang kế hấp thu UV.Vis.

Tất cả các nguyên tử, phân tử, các phức ion đều luôn luôn tìm cách để hiện diện ở trạng thái năng lượng thấp nhất. Khi một phân tử hấp thu ánh sáng, nó được chuyển đến trạng thái kích thích, có mức năng lượng cao hơn (mũi tên lớn, màu đen của hình 2); nó không còn ở trạng thái năng lượng thấp nhất và hệ quả là nó sẽ làm mất phần năng lượng mà nó vừa nhận để trở về trạng thái căn bản. Trong đa số trường hợp, phần năng lượng bị mất ngang qua phương tiện cơ học thí dụ như va chạm với phân tử dung môi. Điện tử quay trở về mức năng lượng căn bản bằng cách đi ngang qua nhiều mức năng lượng dao động (mũi tên nhỏ, màu trắng).

Trong những hợp chất có cấu trúc linh hoạt mềm dẻo (flexible molecule), các mức năng lượng dao động của mức năng lượng điện tử ở trạng thái căn bản hoặc ở trạng thái kích thích nằm ở vùng trùng lắp nhau. Khi các điện tử trở về trạng thái cũ, nó đụng vào các phân tử của dung môi và nó truyền những năng lượng đó qua phân tử dung môi và xuất hiện ra nhiệt.

Tuy nhiên, có thể có trường hợp ***nhảy trực tiếp*** trở về trạng thái căn bản. *Ánh sáng tạo ra do sự nhảy trực tiếp trở về được gọi là huỳnh quang* (fluorescence). Còn ánh sáng trở về trạng thái căn bản sau khi đi ngang qua trạng thái điện tử khác được gọi là lân quang (phosphorescence). Lân quang được xem như hiện tượng huỳnh quang bị làm chậm trễ. Trong cả hai trường hợp, phần năng lượng thu được của quá trình hấp thu bị mất đi ở dạng ánh sáng. Vì đây là ánh sáng ít năng lượng vì một phần đã bị mất đi trong khi dao động, nên ánh sáng này có bước sóng dài hơn so với bước sóng của ánh sáng lúc hấp thu ban đầu, và vật liệu dường như chiếu lấp lánh.

Có thể xem hiện tượng huỳnh quang và hiện tượng lân quang chung lại là hiện tượng huỳnh quang.

Hình 3 trình bày hiện tượng hấp thu, được định lượng bởi định luật Beer-Lambert với I_o là cường độ của ánh sáng tới; I là cường độ tia ló; c: nồng độ mol của chất phân tích trong dung dịch; l: chiều dài khoảng đường ánh sáng di chuyển ngang qua dung dịch mẫu, thường là 1 cm; ε: hệ số hấp thu.

Ý nghĩa $I . I_o$ là độ hấp thu (A_λ) ở một bước sóng xác định nào đó. Đường biểu diễn A_λ hoặc ε theo một bước sóng hoặc một tần số được gọi là phổ hấp thu (absorption spectrum). Các bước sóng tương ứng với mức tối đa trong những phổ hấp thu nói trên được gọi là λ_{max}.

Các số liệu λ_{max} và ε có thể rất hữu dụng như trình bày trong hình 4 và bảng 3.

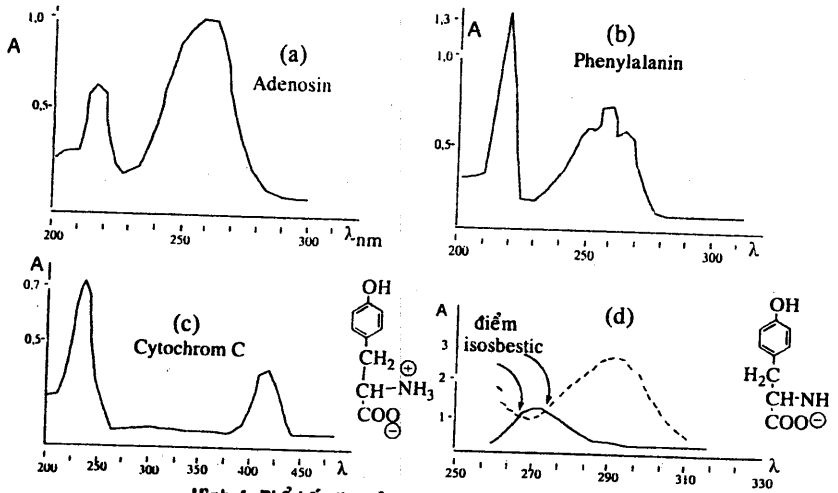
Do mỗi mức năng lượng điện tử (electronic energy level) bao gồm nhiều mức năng lượng dao động (vibrational energy level), cho nên không phải chỉ có một bước sóng mà là một dãy các bước sóng được hấp thu.

Trong điều kiện chuẩn, phổ này được xem như một tính chất cố định của một hợp chất có tính hàm sắc và có thể được sử dụng như để xác định định tính sự hiện diện của hợp chất đó.

Sự phân cực của dung môi cũng có ảnh hưởng ít nhiều lên phổ hấp thu.

Bảng 3: Giá trị λ_{max} và ε của một số hợp chất hữu ích trong sinh hóa.

Hợp chất mang nhóm hàm sắc	λ_{max} (nm)	ε ($mM^{-1}. cm^{-1}$)
Tryptophan	280	5,6
Tyrosin	274	1,4
Phenylalanin	257	0,2
Adenosin	260	14,9
DNA	260	6,6
RNA	260	7,4
Bovin serum albumin	280	40,9



Hình 4: Phổ hấp thu của một vài hợp chất sinh học

Độ hấp thu A được đo ở pH 5 (hình a, b và c) và được ghi theo bước sóng hấp thu.

Hình a: 66 μM adenosin monophosphat có mũi hấp thu đặc trưng ở 260 nm.

Hình b: 5 mM phenylalanin có mũi hấp thu đặc trưng ở 257 nm.

Hình c: 0,7 μg.ml cytochrom C, hợp chất này có màu đỏ, mũi hấp thu đặc trưng ở 410nm

Hình d: 1 mM tyrosin ở pH 6 (đường in liên tục); và ở pH 13 (đường chấm chấm). Nơi hai đường biểu diễn giao nhau của cùng một hợp chất nhưng ở điều kiện đo ở pH khác nhau được gọi là isosbestic.

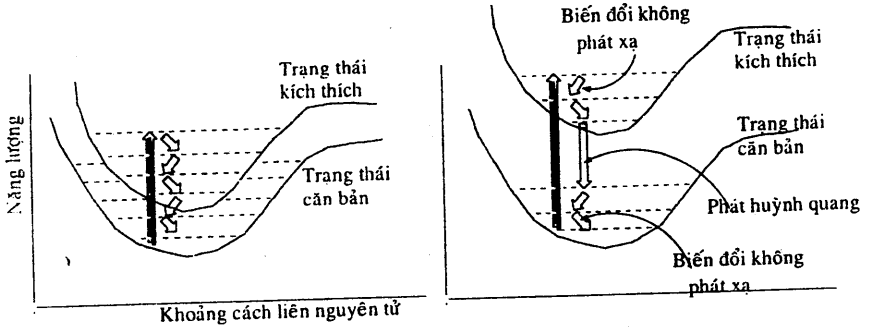
4.1.2. Phổ huỳnh quang (Fluorescence spectroscopy)

a) Nguyên tắc vật lý cơ bản về hiện tượng hùynh quang và các hiện tượng liên quan.

• Hiện tượng huỳnh quang (fluorescence)

Giản đồ Morse giải thích sự biến mất của năng lượng ánh sáng trong phổ hấp thu bằng những sự gia tăng nho nhỏ năng lượng nhiệt khi điện tử va chạm vào các phân tử dung môi. Trong đa số các loại hợp chất, các mức năng lượng dao động của mức năng lượng điện tử ở trạng thái căn bản hoặc ở trạng thái kích thích nằm ở vùng trùng lấp nhau, vì thế điện tử trở về trạng thái căn

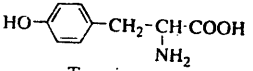
bản bằng một chuỗi những mức trung gian không sinh bức xạ (non-radiative transition).



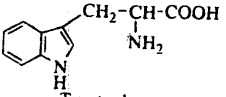
Hình 5: Nguyên tắc vật lý căn bản về hiện tượng huỳnh quang

Trong hoá học, nhóm hàm sắc là những phân tử có cấu trúc cứng ngắt, không linh hoạt, nên chúng chỉ có một ít mức năng lượng dao động. Với những hợp chất này, mức năng lượng dao động của trạng thái căn bản ***không trùng*** với mức năng lượng dao động ở trạng thái kích thích. Khi nhóm hàm sắc của loại phân tử này hấp thu ánh sáng, nó không thể trở về trạng thái căn bản bằng cách đơn giản là làm mất đi phần năng lượng dư thừa của nó. Thay vào đó, xảy ra sự biến đổi có phát xạ, một phần của năng lượng đã được hấp thu trước sẽ được phóng trả lại thành ánh sáng. Hiện tượng như thế gọi là hiện tượng huỳnh quang (fluorescence) và các chất có tính chất như thế được gọi là chất phát huỳnh quang (fluor hoặc fluorophore).

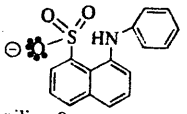
Do ít nhất một vài năng lượng ánh sáng hấp thu lúc ban đầu bị mất đi trong quá trình biến đổi giữa các mức năng lượng dao động, năng lượng ánh sáng phóng thích luôn luôn có bước sóng dài hơn (năng lượng thấp hơn) so với lúc ban đầu. Điều này có nghĩa là các chất phát huỳnh quang có đặc trưng phát huỳnh quang với tính chất giống như phổ hấp thu.



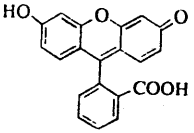
Tyrosin
Chất nội tại huỳnh quang của các protein



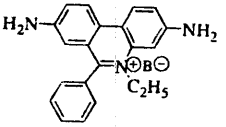
Tryptophan
Chất nội tại huỳnh quang của các protein



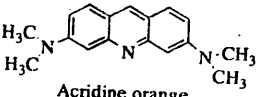
1-Anilino-8-naptalensulfonat
Chất gây phát huỳnh quang cho các protein



Fluorescein
Chất gây phát huỳnh quang cho các protein



Bromur ethidium
Chất gây phát huỳnh quang cho DNA



Acridine orange
Chất gây phát huỳnh quang cho DNA

• ***Hiện tượng lân quang*** (phosphorescence)

Một chất phát huỳnh quang có thời gian ở trạng thái kích thích thường rất ngắn khoảng 0,5-8 ns, tuy vậy trong một số trường hợp, thời gian này lên đến 2 giây. Trường hợp như thế là hệ quả của một hiện tượng có liên quan đến điện tử đó là spin từ (magnetic spin).

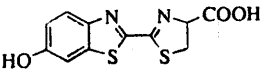
Theo nguyên lý loại trừ Pauli, trong hầu hết các loại nguyên tử, đôi điện tử trong một vân đạo có spin với hai hướng ngược chiều nhau. Những nguyên tử đó hiện diện ở trạng thái electron liên kết độc nhất (singlet) và các điện tử được ghép lại với nhau thành từng cặp (paired). Tuy nhiên, nếu một điện tử được thúc đẩy lên vân đạo có năng lượng cao hơn, spin của nó có thể hướng cùng chiều hoặc ngược chiều với điện tử còn lại trong vân đạo ban đầu, hai spin sẽ song song hoặc đối song (parallel or anti-parallel). Khi được đặt trong một vùng từ trường, nguyên tử này có ba mức năng lượng rõ rệt, được gán cho là -1; 0 và +1 và như thế nguyên tử hiện diện ở trạng thái bộ ba (triplet). Một số nguyên tử nặng có số lẻ điện tử khi ở trạng thái căn bản singlet, sẽ có hai điện tử không ghép cặp chiếm một cách bền vững các vân đạo khác nhau, và ở trạng thái triplet với mức năng lượng cao hơn chút ít so với trạng thái căn bản (thí dụ phân tử có chứa oxygen). Trong những nguyên tử như thế, có thể có sự chuyển đổi giữa trạng thái căn bản singlet (lúc mà các điện tử đối song và ghép cặp) với trạng thái kích thích (các điện tử song song và không ghép cặp nhau). Khi phân tử này trở về trạng thái căn bản, sẽ xảy

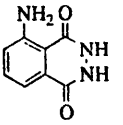
ra sự chuyển đổi triplet-singlet phóng bức xạ, quá trình sự chuyển đổi này lâu hơn sự phát huỳnh quang, và được gọi là hiện tượng lân quang (phosphorescence). Các bức xạ phát ra do quá trình này có bước sóng dài hơn so với của bức xạ huỳnh quang là vì trạng thái triplet năng lượng thấp nhất thường có năng lượng cao hơn chút ít so với năng lượng ở trạng thái căn bản.

• ***Hiện tượng hóa quang*** (chemiluminescence)

Có một hiện tượng khác, hệ quả của sự chuyển đổi phát xạ, được gọi là sự phát quang hóa học (chemiluminescence), xảy ra đối với những phân tử khi chịu một phản ứng hoá học sẽ chuyển qua trạng thái kích thích, sau đó trở về trạng thái căn bản và phóng thích ra ánh sáng. Những phân tử như luciferin (enzym luciferase của con đom đóm) hoặc luminol (peroxidase) có tính chất này.

Luciferin
Chất nền hóa quang
(luciferase trong
con đom đóm)





Luminol
Chất nền hóa quang
(peroxidase)

Khi luciferin, luminol (peroxidase) được sử dụng như chất nền (substract), phóng thích ánh sáng và ánh sáng này có thể được phát hiện và đo đạt. Những phản ứng như thế có thể được áp dụng trong ngành sinh hóa học.

Luciferin + ATP + O_2 $\xrightarrow{\text{(Luciferase con đom đóm)}}$ Oxyluciferin + ATP + pyrophosphat + CO_2 + ánh sáng

Do peroxidase liên kết với kháng thể (antibody) được sử dụng rộng rãi trong hệ thống phát hiện miễn dịch, nên luminol được sử dụng rất nhiều trong lĩnh vực này.

Cả hai hiện tượng lân quang và hóa quang có liên quang đến hiện tượng huỳnh quang về khía cạnh là phát ra ánh sáng. Các hợp chất huỳnh quang và các phân tử có khả năng tạo hoá quang thường có cấu trúc hóa học là những hợp chất vòng cứng ngắt.

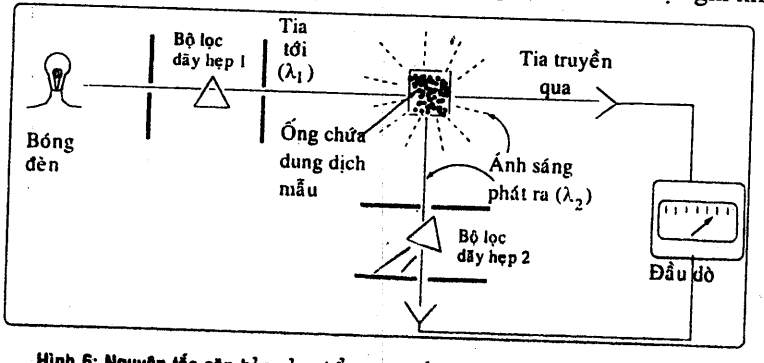
Đa số các cấu phần tạo nên các hợp chất đại phân tử sinh học đều không có tính huỳnh quang và điều này có nghĩa là hiện tượng huỳnh quang có thể cung cấp thông tin cho những qui trình xảy ra trên *những bộ phận đặc*

biệt của hợp chất đại phân tử sinh học đó. Thí dụ, các đơn vị amino acid có tính huỳnh quang quan trọng nhất trong cấu trúc phân tử protein là tryptophan, tyrosin và phenylalanin (trong thực nghiệm, phenylalanin có tính huỳnh quang yếu nhất). Những đơn vị amino acid thường thấy hiện diện trong protein ở hàm lượng lần lượt là 3,5%; 1,1% và 3,5%. Nhiều protein chỉ có một hoặc hai đơn vị amino acid nêu trên. Các base của nucleotide DNA và một vài cofactor enzyme (thí dụ NAD) cũng có tính huỳnh quang dù rằng cường độ thường yếu nhưng cũng được sử dụng để nghiên cứu cấu trúc và hoạt tính của protein.

Hiện tượng huỳnh quang của tyrosin thường bị dập tắt do hệ quả của sự chuyển đổi proton ở trạng thái kích thích.

b) Phương pháp đo hiện tượng huỳnh quang và hiện tượng hóa quang

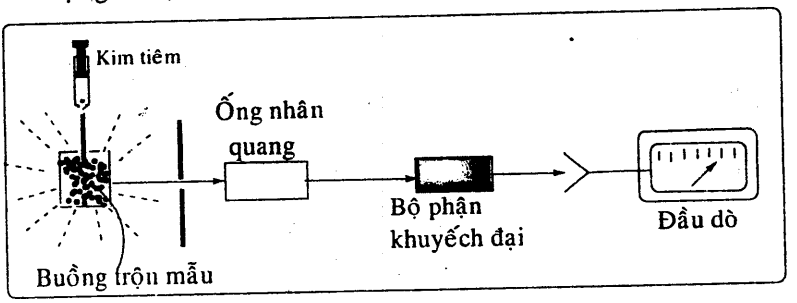
Đo hiện tượng huỳnh quang bằng phổ quang kế huỳnh quang (spectrofluorimeter). Nguyên tắc giống như máy quang phổ hấp thu tử ngoại, nhưng khác ở chỗ máy chỉ đo tia nào có góc 90°C so với tia tới. Ánh sáng phát ra (λ_2) được cho qua một bộ lọc dãy hẹp thứ nhì và được ghi nhận.



Hình 6: Nguyên tắc căn bản của phổ quang kế huỳnh quang tử ngoại. thấy được (Ultraviolet . visible spectrofluororimeter).

Ánh sáng một bước sóng (λ_1) được cho đi ngang qua ống chứa dung dịch mẫu có chứa chất huỳnh quang. Tại những giá trị λ, ánh sáng được hấp thu và phân tử phát huỳnh quang. Ánh sáng huỳnh quang phát ra theo mọi hướng và máy chỉ đo tia nào có góc 90°C so với tia tới. Ánh sáng phát ra (λ_2),

có bước sóng dài hơn ánh sáng hấp thu, được cho qua một bộ lọc dãy hẹp thứ nhì và được ghi nhận.



Hình 7: Nguyên tắc căn bản của phổ quang kế hóa quang (luminometer)

Tác chất thí dụ như luciferin và luciferase đom đóm được bơm vào buồng trộn mẫu. Khi có hiện tượng hóa quang, ánh sáng phát ra theo mọi hướng, một tia này sẽ được chọn lọc đi qua vào một ống nhân quang (photomultiplier tube). Tín hiệu điện tử này được khuếch đại và vào đầu dò. Buồng trộn mẫu được che tránh ánh sáng và cách nhiệt.

4.2. Thiết bị để đo quang phổ hấp thu

4.2.1. Nguồn sáng

Phổ hấp thu được đo bằng máy quang phổ (spectrophotometer). Bức xạ điện từ được tạo ra từ một ngọn đèn, bên trong là một sợi tóc đèn bằng kim loại để dòng điện đi qua. Đèn bằng tungsten-halogen cho các bức xạ có bước sóng trong vùng thấy được (290-900 nm), đèn deuterium cho các bức xạ có bước sóng trong vùng UV (210-370 nm). Ánh sáng phát ra từ những nguồn sáng nói trên bao gồm nhiều bước sóng. Muốn chỉ có một bước sóng thì sử dụng bộ lọc dãy hẹp (monochromator) hoặc trong những máy hiện đại sử dụng bộ nhiễu xạ ánh sáng (diffraction grating) cũng cho cùng một kết quả.

4.2.2. Đầu dò

Ánh sáng sau khi xuyên qua dung dịch mẫu, được phát hiện bởi những ống nhân quang (photomultiplier tube) và đầu dò mạng diod quang. Đầu dò mạng diod quang rẻ hơn ống nhân quang, được cấu tạo bởi những tinh thể silicon sắp xếp thành dãy và có độ nhạy với ánh sáng trong khoảng λ từ 190-

820 nm. Các diod quang hấp thu ánh sáng để sinh ra dòng điện tương ứng với số photon hấp thu. Mỗi diod quang phụ trách một bước sóng xác định trong máy. Với máy có độ phân giải 1 nm, mỗi hai diod quang kề nhau sẽ phụ trách một bước sóng chênh lệch nhau 1 nm; máy có độ phân giải 2 nm, mỗi hai diod quang kề nhau sẽ phụ trách một bước sóng chênh lệch nhau 2 nm. Loại đầu dò mạng diod quang có khả năng quét bức xạ nhanh hơn và có độ nhạy lớn hơn.

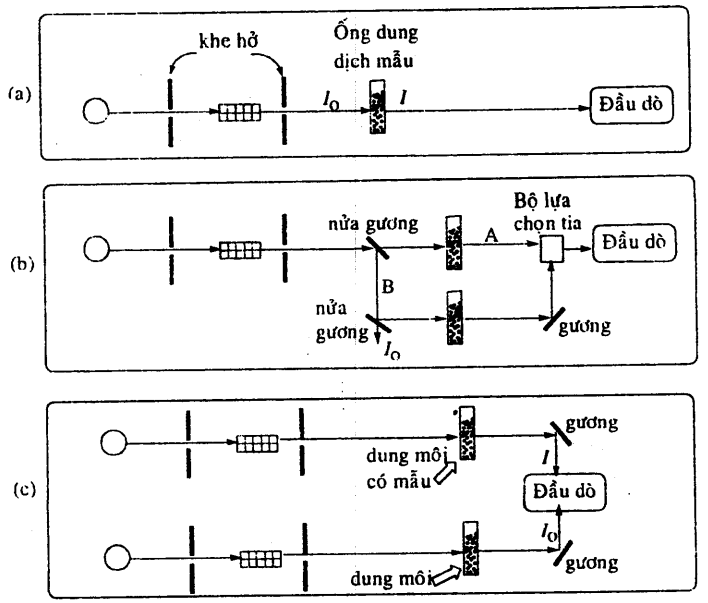
Trong các máy đo quang, có ba kiểu bố trí các bộ phận, được gọi là ***chùm tia đơn*** (single beam), ***chùm tia tach*** (split beam) và ***chùm tia kép*** (dual beam).

4.2.3. Ống chứa dung dịch mẫu (cuvette)

Ống được làm bằng một số vật liệu khác nhau. Ống bằng thủy tinh hoặc nhựa dẻo (plastic) rất tiện lợi khi đo với loại ánh sáng thấy được, nhưng có nhược điểm là nó có thể hấp thu ánh sáng tử ngoại. Ống làm bằng thạch anh (quartz) không hấp thu ánh sáng tử ngoại, dễ bị bể và đắt tiền. Hiện nay ở thị trường có loại ống bằng nhựa dẻo, không hấp thu ánh sáng > 280 nm. Ống bằng plastic có thể bị hư hại khi phải sử dụng dung môi hữu cơ.

Do ống chứa mẫu, cũng như dung môi đều có thể hấp thu ánh sáng, vì thế cần phải luôn luôn khảo sát mẫu trắng (determine a blank spectrum of cuvette plus solvent) bằng cách đo mức hấp thu của ống có chứa dung môi tinh khiết, loại dung môi sử dụng để hòa tan mẫu phân tích, để sau đó làm bài toán trừ lại mức hấp thu năng lượng của mẫu phân tích. Việc này có thể dễ dàng thực hiện với loại bố trí bộ phận máy theo chùm tia kép, một tia đi ngang qua ống chứa dung môi tinh khiết, còn tia kia đi ngang qua ống có chứa mẫu có dung môi.

Các máy quang phổ luôn nối với máy tính để dễ dàng lưu trữ dữ liệu, in sắc ký đồ...



Hình 8: Ba kiểu bố trí chùm tia sáng trong đầu dò

• *Hình a*: Chùm tia đơn.

• *Hình b*: Chùm tia tách. Kiếng nửa gương (half-mirror) cho phép một số tia ló đi ngang qua, phần còn lại sẽ bị phản chiếu. Hai tia A và B đều được tạo ra cùng một nguồn. Một trong những ống chứa mẫu sẽ là mẫu trắng (a blank) và như thế giá trị của mẫu đo sẽ được tự động trừ bớt. Ghi nhận rằng ở bất kỳ thời điểm nào, đầu dò cũng đo cùng lúc ánh sáng từ A và B nhờ vào bộ lựa chọn tia (Beam selector).

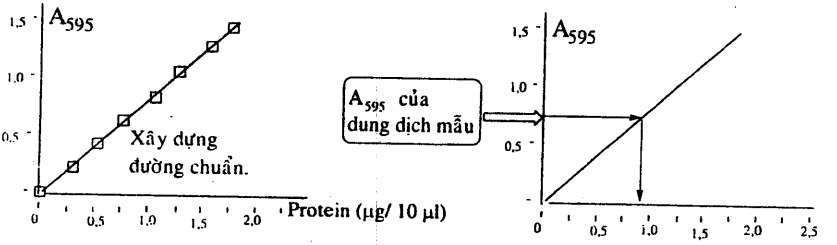
• *Hình c*: Chùm tia kép. Hai nguồn tạo ra hai tia khác nhau.

4.3. Thí dụ về ứng dụng quang phổ hấp thu

Sự hấp thu quang lệ thuộc trực tiếp vào nồng độ mol của một hợp chất nên có thể được sử dụng để đo nồng độ của hợp chất nhờ vào đường chuẩn đã xây dựng trước đó.

Biết rằng hợp chất Coomassie blue kết hợp với protein tạo thành một phức chất có mức hấp thu cực đại ở 596 nm. Trước tiên, xây dựng đường chuẩn bằng cách pha hợp chất chuẩn bovin serum albumin thành các dung dịch có nồng độ biết trước; cho tạo phức với Coomassie blue, đo mức hấp thu ở bước

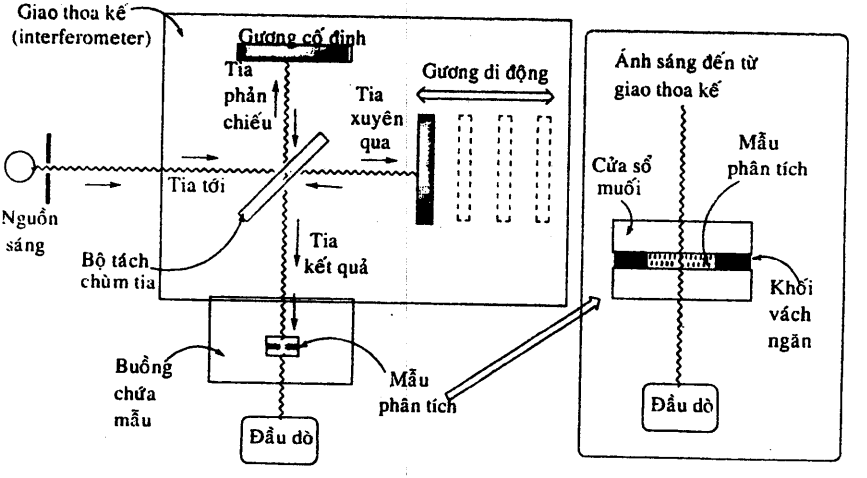
sóng 595 nm, có đường biểu diễn của mức hấp thu theo nồng độ. Sau đó, một dung dịch protein chưa biết nồng độ sẽ cho tạo phức và đo mức hấp thu quang, nhờ đường chuẩn sẽ có thể suy ra nồng độ protein có trong dung dịch.



Hình 9: Xác định nồng độ protein trong dung dịch sử dụng đường chuẩn theo phương pháp Bradford

4. PHỔ HỒNG NGOẠI

Hiện nay các phòng thí nghiệm thường sử dụng phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (Fourier transform infrared spectrometry, FTIR). Nguồn sáng đi vào giao thoa kế, chạm đến bộ tách chùm tia (beam splitter; half mirror; được làm bằng tinh thể KBr) bộ phận này được đặt 45° so với hướng của tia tới, hệ quả là phân nửa ánh sáng được phản chiếu để đến gương cố định, còn phân nửa ánh sáng còn lại được truyền qua để đến gương có thể dịch chuyển.

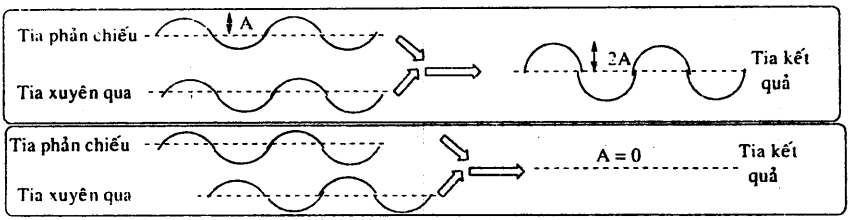


Hình 10: Mô tả nguyên tắc máy đo phổ hồng ngoại, với nguồn sáng, giao thoa kế, buồng chứa mẫu và đầu dò

Tia được phản chiếu từ gương cố định được gọi là *tia phản chiếu* (reflected beam) và tia được phản chiếu từ gương di động được gọi là *tia xuyên qua* (transmitted beam); hai tia được kết hợp với nhau để thành *tia kết quả*. Hai loại tia: tia phản chiếu và tia xuyên qua có thể gây cản trở cho nhau.

✳ Nếu hai loại tia này trùng lên nhau (cùng pha), chúng làm gia tăng cho nhau và nhờ thế tia kết quả có cường độ là tổng cường độ của mỗi loại tia hợp thành (A+ A = 2A).

✳ Nếu hai loại tia lệch pha 180° (lệch pha), chúng triệt tiêu nhau và như thế tia kết quả có cường độ là zero (A = 0). Nếu hai loại tia lệch pha ít hơn 180° (lệch pha), tia kết quả có cường độ trong khoảng 0 đến 2A.



Tia kết quả có cường độ lớn hay nhỏ là tuỳ vào vị trí tương đối của gương di động. Tia này đi xuyên ngang qua mẫu phân tích, được đầu dò ghi nhận và phân tích bởi sự chuyển đổi Fourier để tạo thành phổ hồng ngoại.

Với phổ IR, mẫu có thể ở thể rắn, lỏng hoặc khí và như thế cần chọn loại buồng chứa mẫu phù hợp. Bộ phận chứa mẫu không thể được làm bằng thủy tinh hoặc nhựa dẻo (plastic) vì đây là hai nguyên liệu tạo nên từ những phân tử có chứa nối hóa trị nên sẽ hấp thu ánh sáng IR, làm ảnh hưởng việc đọc kết quả. Các loại muối vô cơ như NaCl và NaBr, các nguyên liệu ion sẽ không hấp thu ánh sáng IR vì các nối ion không thể thực hiện sự chuyển đổi dao động năng lượng. Nối hóa trị có thể dao động (vibrate) còn nối ion thì không.

• Với mẫu là chất lỏng tinh chất hoặc được hoà trong dung môi: mẫu được đặt thành một lớp mỏng, ở giữa hai lớp vật liệu được làm từ các tinh thể muối NaCl hoặc NaBr. Mỗi miếng vật liệu tinh thể muối có kích thước khoảng 2 cm chiều ngang, 3 cm chiều dài và chiều dầy 0,5 cm. Vật liệu này

rất háu nước và rất dễ bị hư hại nếu gặp hơi nước.

• Với mẫu là chất rắn: mẫu phân tích khô được trộn đều với tinh thể KBr (mẫu chỉ được có tỉ lệ 0,1–2 % so với lượng KBr, nồng độ mẫu quá nhiều sẽ không có được phổ rõ đẹp) rồi được cho vào một máy ép hoặc một con đội để nén thành một miếng tròn, dẹp, hầu như trong suốt; miếng này được đặt vào máy đo IR ở vị trí sao cho *tia kết quả* truyền ngang qua.

Cũng có thể sử dụng Nujol (một loại dầu mỏ): một lượng nhỏ mẫu khô được cho trộn đều với nujol sẽ tạo thành một chất nhìn giống như kem đánh răng. Hỗn hợp này được đặt vào cửa sổ NaCl hoặc NaBr.

5. ĐIỆN DI

5.1. Cấu trúc hoá học của các kháng thể, các immunoglobulin

Cơ thể của người và các loài động vật có xương sống có thể chống cự được sự xâm hại của các yếu tố gây bệnh đến từ bên ngoài cơ thể thí dụ như vi trùng, vi khuẩn, nấm mốc... là nhờ vào các kháng thể được tạo ra bởi cơ thể của người và các loài động vật.

Kháng nguyên (antigen) là những hợp chất lạ ở bên ngoài cơ thể người. Kháng thể (antibody) là các protein do cơ thể của con người đã tổng hợp tạo thành với mục đích chống trả các kháng nguyên.

Các kháng thể còn được gọi là các "immunoglobulin" (viết tắt là Ig) bao gồm các loại IgM, IgG, IgA (bao gồm luôn IgD) và IgE.

Cấu trúc của các kháng thể: mỗi Ig được cấu tạo bởi 4 chuỗi dây

✳ Hai dây dài, cấu tạo giống hệt nhau. Được gọi là gamma (γ) cho kháng thể IgG, là mu (μ) cho kháng thể IgM, là alpha (α) cho kháng thể IgA, là delta (δ) cho kháng thể IgG và là epsilon (ε) cho IgE.

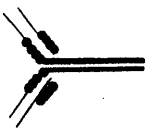
✳ Hai dây ngắn, cấu tạo giống hệt nhau, có trọng lượng phân tử nhỏ hơn các dây dài nêu trên, được gọi là kappa (κ) và lamda (λ).

Bốn dây được nối lại với nhau bởi các cầu nối disulfur. Các dây dài còn được gắn thêm các phân tử đường. Phần dây (chứa khoảng 100 đơn vị amino acid) mà có đầu dây chứa nhóm chức $-NH_2$ được gọi là ***vùng biến đổi***

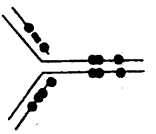
(variable), phần dây mà có đầu dây chứa nhóm chức –COOH được gọi là *vùng cố định* (constant). Chính *phần biến đổi* của các kháng thể mới có thể gắn một cách đặc hiệu vào các kháng nguyên.

Theo qui ước, một kháng thể được biểu diễn là một hình chữ Y trong đó hai nhánh (thường được gọi là hai cách tay) của hình chữ Y này giống nhau và có chứa nhóm chức $-NH_2$; mỗi cánh tay có một vị trí để nối với kháng nguyên.

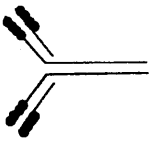
Ngoài ra, các phân tử kháng thể cũng có thể hoạt động như một kháng nguyên. Người ta xác định thấy trên một kháng thể có ba vùng kháng nguyên được gọi tên là: isotype, allotype và idiotype



Isotype
Thay đổi tùy theo từng loài (chung ở trên vùng cố định của hai dây dài và hai dây ngắn)



Allotype
Thay đổi tùy theo từng loại protein (có nhiều vị trí ở trên vùng cố định của hai dây dài và hai dây ngắn)



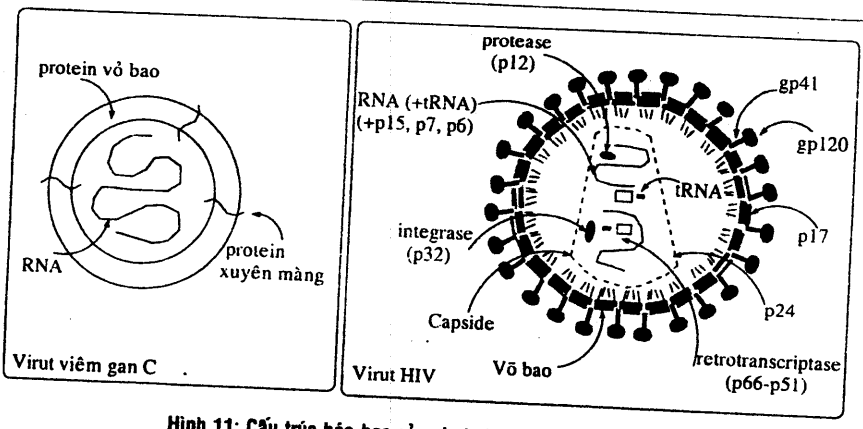
Idiotype
Thay đổi tùy theo từng loại kháng thể (chung ở trên vùng biến đổi của hai dây dài và hai dây ngắn)

5.2. Cấu trúc hoá học của virut HIV (human immunodeficiency virus)

Có hai virut gây nên hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải cho cơ thể người (SIDA) là HIV1 và HIV2. Hai virut này có cấu trúc gần giống nhau và đều thuộc loại retrovirus. Retrovius là loại virut RNA. Vì vậy khi muốn phát triển, nó phải xâm nhập vào DNA của tế bào chủ, rồi vì nó có men phiên mã ngược nên có thể phiên mã bộ gen RNA thành DNA để nó có thể nhân lên.

Cấu trúc của virut HIV-1 bao gồm ba *protein cấu tạo* là: gag, pol, env và sáu *protein mã hoá* ký hiệu là nef, tat, rev, vif, vpr và ***vpu***. Cấu trúc của virut HIV-2 cũng tương tự với gag, pol, env, nef, tat, rev, vif, vpr và *vpx* (sự khác biệt do protein này).

Các tên viết tắt của protein: nef: negative regulatory factor, tat: transactivator of transcription, rev: regulation of virion proteins, vif: virion infectivity factor, vpr: viral protein r, vpu: viral protein u.



Hình 11: Cấu trúc hóa học của virut viêm gan C và virut HIV

Virut HIV có dạng hình cầu, gồm một vỏ bao chung quanh một nhân nang (capside) có dạng hình tù hoặc hình nón cụt. Ở trong nhân có RNA của vịrut cùng với những phân tử cần thiết để bảo vệ và để xúc tiến sự lây nhiễm.

Vỏ bao (envelope) của virut: giống một màng tế bào lipid, có mang nhiều "cây đinh". Vỏ bao được ký hiệu là Pr gp160 (env), là tiền chất (precursor) của các glycoprotein của vỏ bao. Các protein vỏ bao này đóng một vai trò quan trọng trong quá trình virut HIV gắn vào, rồi thâm nhập vào bên trong tế bào chủ.

Theo qui ước, ký hiệu "gp" hoặc "p" để chỉ một protein có gắn phân tử đường (*glyco*protein). Con số ghi liền ngay sau chữ gp hoặc chữ p để chỉ trọng lượng biểu kiến, tính bằng kilodalton, của protein.

* **Pr gp160 (env)**, gồm

Protein gp120: là phần đầu của hình cây đinh, hướng ra bên ngoài của vỏ bao.

Protein gp41: protein xuyên màng, gắn phần đầu đinh vào vỏ bao.

* **Pr p55 (gag)**: tiền chất của nó là các protein gag.

p17: protein bao bọc phía bên trong của lớp vỏ

p24: protein của capside

p15, p7, p6: các protein của nucleocapsid liên kết chặc chẽ với với RNA virut

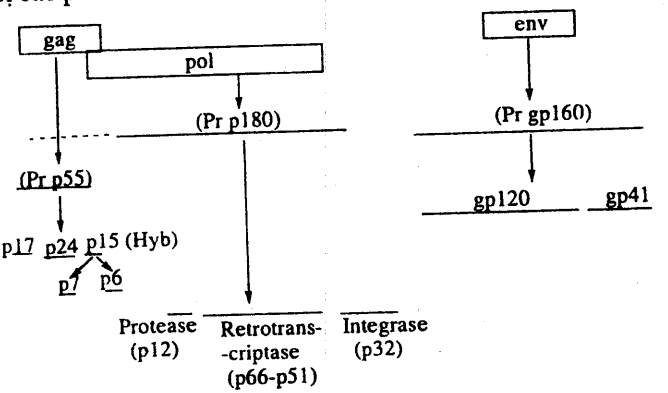
✳ **Pr p180 (gag-pol):** tiền chất của nó là các protein gag và pol.

retrotranscriptase (p66-p51)

integrase (p32)

protease (p12)

Vậy, các protein tìm thấy trong virut được tạo thành từ các tiền chất (polyprotein) là Pr gp160 (env), Pr p55 (gag) và Pr p180 (gag-pol); các tiền chất này bị các protease cắt thành những protein khác nhau.



5.3. Thử nghiệm tổng quát để phát hiện các kháng thể

Muốn chẩn đoán một bệnh nhân có bị phơi nhiễm HIV, người ta tìm sự hiện diện của các kháng thể trong máu 2-3 tháng (đôi khi thời gian lâu hơn nữa) sau khi bị nghi là đã bị sơ nhiễm. Đó là sự hiện diện của các kháng thể chống lại các protein khác nhau của virut, thường là gen mã hoá từ gag, pol và chủ yếu là env.

Các thử nghiệm tổng quát để phát hiện các kháng thể: thử nghiệm enzym kháng thể dùng để phát hiện trong huyết tương sự hiện diện của kháng thể kháng HIV và không phân biệt đó loại kháng thể nào, thực hiện như sau.

***Tác chất** sử dụng trong thử nghiệm là các protein virut được cho gắn lên các hạt rắn siêu mịn (pha tĩnh rắn). Các protein virut này có thể có được bằng cách lấy từ môi trường nuôi cấy tế bào hoặc bằng sự tổng hợp gen hoặc tổng hợp hóa học.*

Huyết tương thử nghiệm (có chứa hoặc không chứa các kháng thể) được đặt vào môi trường thử nghiệm, nếu nó có chứa các kháng thể đặc hiệu của HIV, kháng thể đó sẽ dính nối vào các kháng nguyên đã được cố định. Sau khi rửa để loại bỏ các kháng thể không dính nối, một kháng thể thứ nhì sẽ được cho thêm vào –đây là một loại kháng thể kháng-kháng thể người, được ghép cố định vào một enzym. Bấy giờ, tới lượt của nó sẽ gắn dính vào kháng thể-kháng HIV đã được cố định vào một pha tĩnh rắn. Sau khi rửa lần thứ nhì, một hợp chất có khả năng tạo màu được cho thêm vào. Enzym sẽ tác dụng với hợp chất có khả năng tạo màu đó để thành một phức có màu. Cường độ của màu này sẽ tỷ lệ với nồng độ của kháng thể hiện diện trong huyết tương.

Có nhiều kỹ thuật khác nhau, chúng khác nhau ở các điểm như: cấu tạo của pha tĩnh rắn, kháng nguyên cố định, kháng thể thứ nhì, hợp chất có khả năng tạo màu. Để đạt độ tin cậy cao, cần phải thực hiện qua hai thử nghiệm với hai loại tác chất khác nhau.

Từ năm 1987, người ta sử dụng loại thử nghiệm phát hiện đồng thời sự phơi nhiễm HIV-1 và HIV-2. Tác chất sử dụng trong thử nghiệm (các kháng nguyên) là các peptid tổng hợp, tương ứng với vùng ngắn của gp41 (mã hoá từ env).

Đây là phản ứng tổng quát, nếu kết quả âm tính, sẽ ngưng ở giai đoạn này, nếu kết quả dương tính, cần thực hiện thêm với thử nghiệm Western-blot.

5.4. Thử nghiệm Western-blot (thử nghiệm khẳng định)

Thử nghiệm này chính xác và đặc hiệu hơn vì cho thấy sự hiện diện của các kháng thể khác nhau.

Trước tiên, các protein virut (sử dụng như là tác chất) được tách bằng điện di trên gel tuỳ vào trọng lượng phân tử của chúng. Tiếp theo, thực hiện sự chuyển điện di (electrotransfer) để chuyển các protein trong các dãy trên bản gel sang một tấm nitrocellulose. Huyết tương của người thử nghiệm được áp dụng lên tấm nitrocellulose. Sự kết dính giữa các *kháng thể* có trong huyết tương người *với các kháng nguyên* có trong các dãy trên bản cellulose được phát hiện bởi một phản ứng enzym tạo phức có màu như trình bày ở phần 5.3.

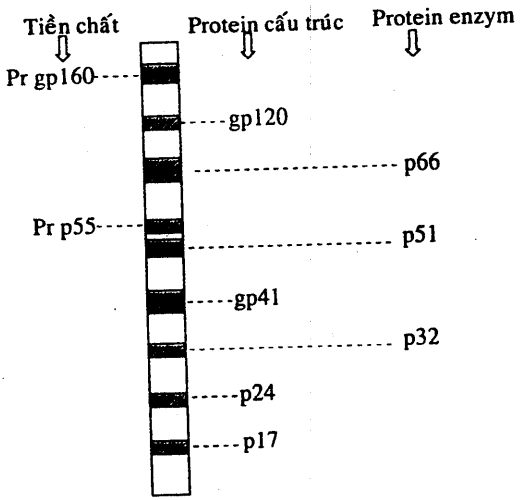
Kết quả thử nghiệm được trình bày dưới các ký hiệu: (-) hoặc (+) hoặc (++). Thí dụ với HIV-1 cần có sự hiện diện của các protein: gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p32, p24, p17. Một kết quả chắc chắn dương tính khi tất

cả các dãy nêu trên đều xuất hiện.

Tùy theo các tổ chức quốc tế mà tiêu chuẩn để được xem là dương tính có sự thay đổi. Theo trung tâm kiểm soát bệnh Atlanta, một huyết tương dương tính phải chứa ít nhất là phải có dãy băng gp160.120 hoặc gp41 và kết hợp với một dãy băng đặc trưng của protein env, gag, pol (Như thế, nghĩa là phải có dãy gp160.120 và dãy p24).

Các kết quả thực hiện đôi khi rất khó xác định sự dương tính là do sự miễn dịch của bệnh nhân, các bệnh nhân mắc phải SIDA phải trải qua nhiều giai đoạn mà có những giai đoạn khó xác định. Cần phải có sự xác định của cơ quan chuyên ngành.

Có những dãy băng xác định kháng thể kháng HIV-1 và có những dãy băng khác xác định kháng thể kháng HIV-2



Hình 12: Western-blot: Các protein virut, sử dụng như là tác chất, được tách bằng điện di trên gel tuỳ vào trọng lượng phân tử của chúng.

Các dãy màu đen quan sát trên bản gel tương ứng với các kháng thể (có trong huyết tương thử nghiệm) nhận ra được các protein antigen của HIV.

Ký hiệu: Pr: tiền chất. p: protein, gp: glycoprotein. Các con số sau chữ p, gp là trọng lượng phân tử biểu kiến tính bằng kDa

MỤC LỤC

Trang

Chương 1: KỸ THUẬT CHIẾT TÁCH HỢP CHẤT TỰ NHIÊN RA KHỎI CÂY CỎ

1. Quá trình khảo sát hoá-thực vật của một cây 9

1.1. Lựa chọn nghiên cứu trên một loài cây của một họ 9

1.2. Xác định tên khoa học cho cây 10

1.3. Xử lý mẫu cây sau khi thu hái 12

1.4. Dung môi để chiết tách hợp chất ra khỏi mẫu cây 14

1.5. Lựa chọn qui trình để chiết tách hợp chất ra khỏi mẫu cây 20

2. Các kỹ thuật chiết tách hợp chất ra khỏi cây 28

2.1. Kỹ thuật chiết lỏng-lỏng 28

2.2. Kỹ thuật chiết rắn-lỏng 34

2.3. Các chất gây trở ngại cho việt chiết tách. Chất giả tạo 54

2.4. Một số thủ thuật khi cô lập hợp chất hữu cơ 64

3. Phân tích sơ bộ hóa-thực vật một số cao chiết 70

3.1. Tìm hiểu một số đặc điểm của cao chiết 70

3.2. Phân tích hoá-thực vật của cao chiết 73

Chương 2: PHƯƠNG PHÁP NHẬN DANH CÁC LOẠI HỢP CHẤT TỰ NHIÊN

1. Alcaloid 80

1.1. Đại cương 80

1.2. Phương pháp định tính sự hiện diện alkaloid trong bột cây 82

1.3. Các thuốc thử để định tính alkaloid 83

1.4. Phương pháp chiết tách alkaloid ra khỏi cây 85

2. Flavonoid 91

2.1. Đại cương 91

2.2. Các thuốc thử để định tính sự hiện diện của flavonoid 93

2.3. Phương pháp chiết tách flavonoid ra khỏi cây 95

3. Sesquiterpen lacton 98

3.1. Đại cương 98

3.2. Các thuốc thử để định tính sesquiterpen lacton 99

3.3. Phương pháp chiết tách sesquiterpen lacton ra khỏi cây 103

4. Terpenoid. Steroid 103

4.1. Đại cương 103

4.2. Các thuốc thử để định tính terpenoid, steroid 111

4.3. Phương pháp chiết tách terpenoid, steroid ra khỏi cây 113

5. Chất béo 116

5.1. Đại cương 116

5.2. Các thuốc thử để định tính sự hiện diện của chất béo 122

5.3. Phương pháp chiết tách chất béo ra khỏi cây 124

6. Hợp chất glycosid 125

6.1. Đại cương 125

6.2. Phương pháp chiết tách glycosid ra khỏi cây 127

6.3. Phương pháp thủy giải glycosid để xác định phần đường 128

6.4. Các thuốc thử để định tính phần đường 132

6.5. Các thuốc thử để định tính saponin 135

6.6. Các thuốc thử để định tính glycosid tim 137

6.7. Các thuốc thử để định tính aglycon iridoid 138

7. Hợp chất phenol 138

7.1. Đại cương 138

7.2. Các thuốc thử để định tính sự hiện diện của phenol 145

7.3. Phương pháp chiết tách phenol ra khỏi cây 147

Chương 3: SẮC KÝ CỘT

1. Các nguyên tắc căn bản của kỹ thuật sắc ký 151

1.1. Phân loại sắc ký theo bản chất hai pha sử dụng 153

1.2. Phân loại sắc ký theo bản chất hiện tượng xảy ra trong quá trình tách chất 154
1.3. Phân loại sắc ký theo cấu hình 159

2. Các loại pha tĩnh sử dụng trong sắc ký 165

2.1. Silica gel 166
2.2. Alumina 172
2.3. Kieselguhr-Celite 173
2.4. Bột giấy 174
2.5. Gel 175

3. Sắc ký cột hở 180

3.1. Lựa chọn chất hấp thu và dung môi khởi đầu giải ly 181
3.2. Tỉ lệ giữa lượng mẫu chất cần tách đối với kích thước cột 183
3.3. Nạp chất hấp thu vào cột 185
3.4. Đặt mẫu chất cần tách lên đầu cột sắc ký 187
3.5. Các kỹ thuật giải ly chất ra khỏi cột 189
3.6. Dung môi giải ly và kỹ thuật tăng dần tính phân cực cho dung môi giải ly 191
3.7. Vận tốc giải ly cột 194
3.8. Theo dõi quá trình giải ly cột 195
3.9. Tổng kết quá trình sắc ký cột 196
3.10. Các phương pháp xác định cấu trúc hoá học một hợp chất 200

4. Một vài kỹ thuật sắc ký cột khác 202

4.1. Sắc ký cột khô 203
4.2. Sắc ký chớp nhoáng 204
4.3. Sắc ký nhanh-cột khô 206

Chương 4: SẮC KÝ LỚP MỎNG

1. Kiến thức tổng quát về sắc ký lớp mỏng 213

1.1. So sánh sắc ký lớp mỏng với các kỹ thuật sắc ký khác 214
1.2. Sắc ký hấp thu 216

1.3. Các chất hấp thu dùng trong sắc ký lớp mỏng 219
1.4. Chất cho thêm vào 224
1.5. Dung môi giải ly 224
2. Các chuẩn bị trước khi sắc ký lớp mỏng 228
2.1. Chuẩn bị vi quản 228
2.2. Chấm mẫu lên bản mỏng 229
2.3. Giải ly bản mỏng 231
3. Thực hành tráng sắc ký lớp mỏng 234
3.1. Chuẩn bị tráng tấm bản mỏng 324
3.2. Các kỹ thuật tráng tấm bản mỏng 235
3.3. Hoạt hoá chất hấp thu 238
3.4. Hiện hình các vết sau khi giải ly 239
4. Các công dụng của sắc ký lớp mỏng 244
4.1. Để công bố đặc điểm của hợp chất vừa chiết tách cô lập 244
4.2. Để kiểm tra xem hai hợp chất có giống nhau 245
4.3. Để tìm hiểu sơ bộ về tính chất của mẫu chất cần khảo sát 247
4.4. Để chuẩn bị cho việc sắc ký cột 249
4.5. Để theo dõi diễn tiến của một phản ứng hoá học 251
4.6. Để kiểm tra biết một hợp chất kém bền 252
4.7. Để cô lập hợp chất 252
5. Sắc ký lớp mỏng của một số hợp chất hữu cơ 255
5.1. Sắc ký lớp mỏng của amino acid 255
5.2. Sắc ký lớp mỏng của peptid, protein 258
5.3. Sắc ký lớp mỏng của carbohydrat 261
5.4. Sắc ký lớp mỏng của lipid 266
5.5. Sắc ký lớp mỏng của flavonoid 272
5.6. Sắc ký lớp mỏng của carotenoid 276
5.7. Sắc ký lớp mỏng của clorophyl 279
5.8. Sắc ký lớp mỏng của quinon 280

Chương 5: SẮC KÝ TRAO ĐỔI ION

1. Các kiến thức căn bản về sắc ký trao đổi ion 284
1.1. Các đặc điểm tổng quát của nhựa trao đổi ion 284
1.2. Lý thuyết về sự trao đổi ion 285
1.3. Các nguyên liệu sử dụng làm nhựa trao đổi ion 288
2. Một số kiến thức căn bản trong thực nghiệm trên nhựa trao đổi ion 293
2.1. Chọn loại nhựa trao đổi ion phù hợp 293
2.2. Thí nghiệm để biết số lượng nhựa cần thiết 298
2.3. Chọn loại dung dịch đệm 301
2.4. Làm trương nở nhựa trước khi thực nghiệm 302
2.5. Tái tạo nhựa. Tồn trữ nhựa 304
3. Sắc ký trao đổi ion, sử dụng cột hoặc becher 305
3.1. Lựa chọn kích thước cột sắc ký 305
3.2. Nhồi nhựa vào cột. Nạp mẫu chất vào đầu cột 307
3.3. Giải ly cột trao đổi ion 308
3.4. Vận tốc giải ly cột 310
3.5. Sắc ký trao đổi ion sử dụng becher 310
4. Một số áp dụng của sắc ký trao đổi ion 312
4.1. Các hợp chất anion 313
4.2. Các hợp chất cation 315

Chương 6: SẮC KÝ GEL

1. Nguyên tắc căn bản của sắc ký gel 323
2. Nguyên liệu làm thành hạt gel 325
2.1. Gel dextran 326
2.2. Gel polyacrylamid 330
2.3. Gel styragel 331
3. Các nguyên tắc căn bản về thực hành sắc ký gel 332

3.1. Nhồi gel vào cột 332
3.2. Nạp mẫu chất vào đầu cột 333
3.3. Triển khai sắc ký 334
3.4. Gel Sephadex LH-20 334
4. Sắc ký lớp mỏng với kỹ thuật sắc ký gel 339
4.1. Kích thước tấm bản gel 339
4.2. Lượng gel cần để tráng bản 339
4.3. Phương pháp triển khai bản mỏng gel 340
5. Các ứng dụng của sắc ký gel 342
5.1. Để xác định trọng lượng một đại phân tử 342
5.2. Để tách một hỗn hợp thành các nhóm hợp chất riêng rẽ 347
5.3. Để loại bỏ muối ra khỏi một hợp chất hoặc dung dịch 347
5.4. Để loại bỏ các chất màu tạp bẩn ra khỏi hợp chất đang khảo sát 348

Chương 7: SẮC KÝ KHÍ (GC)

1. Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả tách chất trong sắc ký khí 356
1.1. Áp suất hơi của một hợp chất 356
1.2. Đặc trưng của các loại cột sắc ký khí 359
1.3. Độ phân giải 360
2. Các bộ phận của máy sắc ký khí 363
2.1. Khí mang 363
2.2. Bộ phận đưa mẫu vào máy 365
2.3. Cột sắc ký khí 366
2.4. Bộ phận phát hiện tín hiệu 367
3. Nguyên liệu làm pha tĩnh trong sắc ký khí 368
3.1. Loại cột nhồi trong sắc ký khí-lỏng 368
3.2. Loại cột mao quản hở trong sắc ký khí-lỏng 373
3.3. Loại cột trong sắc ký khí-rắn 375

4. Các loại đầu dò trong máy sắc ký khí 380
4.1. Đầu dò dẫn nhiệt 380
4.2. Đầu dò ion hóa ngọn lửa 382
4.3. Đầu dò bắt điện tử 384
4.4. Đầu dò nitrogen-phosphor 387
4.5. Đầu dò trắc quang ngọn lửa 388
4.6. Đầu dò quang ion hoá 389
4.7. GC-MS và GC-IR 391
5. Chuẩn bị mẫu trước khi phân tích bằng sắc ký khí 394
5.1. Sự silyl hoá 395
5.2. Sự acyl hoá 396
5.3. Sự alkyl hóa, sự ester hoá 396
6. Các yếu tố ảnh hưởng đến việc tách mẫu 397
6.1. Lựa chọn loại cột 398
6.2. Lựa chọn nhiệt độ, chương trình nhiệt độ 399
6.3. Một số vấn đề thường gặp trong quá trình sắc ký khí 400
7. Các ứng dụng của sắc ký khí 402

Chương 8: SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)

1. Các bộ phận của máy HPLC 409
1.1. Bình chứa dung môi giải ly cột 409
1.2. Máy bơm 412
1.3. Cột sắc ký 412
1.4. Bộ phận chích mẫu vào máy 412
1.5. Đầu dò 413
2. Các loại pha tĩnh để nhồi cột sắc ký HPLC 413
2.1. Pha thường 414
2.2. Pha tạo nối 416
3. Các loại đầu dò trong HPLC 426

3.1. Đầu dò đo hấp thu tia tử ngoại 428
3.2. Đầu dò mạng diod quang 429
3.3. Đầu dò phát huỳnh quang 431
3.4. Đầu dò chỉ số khúc xạ 432
3.5. Đầu dò đo độ dẫn điện 433
3.6. Đầu dò amper kế 435
3.7. Đầu dò LC-IR 438
3.8. Đầu dò LC-MS 439
3.8.1. Giao diện tia nhiệt 442
3.8.2. Giao diện ion hoá ở áp suất khí quyển 442
3.8.3. Giao diện phun ion 444
38.4. Giao diện chùm tia hạt 448

4. Điều chế các hợp chất phân tích thành chất dẫn xuất 448

4.1. Tạo dẫn xuất trước khi hợp chất đi vào cột sắc ký 449
4.2. Tạo dẫn xuất sau khi hợp chất đi ra khỏi cột sắc ký 450

Chương 9: ĐIỆN DI

1. Các kiến thức căn bản về điện di 455

1.1. Căn bản vật lý của điện di 455
1.2. Các yếu tố ảnh hưởng lên vận tốc điện di 458
1.2.1. Điện trường 458
1.2.2. Dung dịch đệm 458
1.2.3. Môi trường chất mang 459
1.3. Hiện hình bản gel điện di 464
1.4. Điện di với pH liên tục. Điện di với pH không liên tục 465
1.5. Cô lập hợp chất nhờ điện di 468

2. Điện di làm biến tính mẫu phân tích 468

2.1. Điện di với gel SDS polyacrylamid 468
2.2. Điện di với gel SDS polyacrylamid trong điều kiện khử 471

3. Điện di hội tụ 473

3.1. Cấu trúc của chất điện ly lưỡng tính 474

3.2. Điện di đo điểm đẳng điện 476
3.3. Sắc ký hội tụ 478
4. Điện di SDS-PAGE hai chiều 480
4.1. Nguyên tắc căn bản SDS-PAGE hai chiều 481
4.2. Các thiết bị sử dụng trong SDS-PAGE hai chiều 481
5. Kỹ thuật điện thấm 482
5.1. Thiết bị sử dụng trong kỹ thuật điện thấm 483
5.2. Các ứng dụng của kỹ thuật điện thấm 483
6. Điện di miễn dịch 484
6.1. Kỹ thuật Dot-blotting 485
6.2. Western blotting 488

Phụ lục 492

Mục lục 519

PHƯƠNG PHÁP CÔ LẬP HỢP CHẤT HỮU CƠ

Nguyễn Kim Phi Phụng

NHÀ XUẤT BẢN
ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP HỒ CHÍ MINH
Khu phố 6, phường Linh Trung, quận Thủ Đức, TP HCM
ĐT: 7 242 181, 7 242 160 + (1421, 1422, 1423, 1425, 1426)
Fax: 7 242 194 - **Email:** vnuhp@vnuhcm.edu.vn

***

Chịu trách nhiệm xuất bản
PGS TS NGUYỄN QUANG ĐIỂN

Biên tập
TRẦN VĂN THẮNG

Sửa bản in
THÙY DƯƠNG

Trình bày bìa
LÊ NGUYỄN

Đơn vị/Người liên kết
Trường ĐH Khoa học tự nhiên – ĐH Quốc gia TP Hồ Chí Minh

In 500 cuốn, khổ 16 x 24cm. Số đăng ký kế hoạch xuất bản: 732-2006/CXB/47-72/ĐHQGTPHCM. Quyết định xuất bản số: 448/QĐ-ĐHQGTPHCM ngày 08/6/2007.

In tại Xưởng in Trường Đại học Khoa học Tự nhiên ĐHQG TP. HCM, nộp lưu chiểu tháng 6 năm 2007.